

Proteomikkstudie av linsekapsler av pasienter med grå stær

Thanh-Tam Nguyen



Avdeling for Farmasøytisk Kjemi

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

2010

PROTEOMIKKSTUDIE AV LINSEKAPSEL FRA PASIENTER MED GRÅ STÆR

Thanh-Tam Nguyen

Masteroppgaven ble utført ved Faggruppen for Legemiddelanalyse,

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi,

Farmasøytisk Institutt ved Universitetet i Oslo i perioden februar 2009 til mai 2010.

Veiledere:

Professor Léon Reubsaet, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Professor dr. med. em. Amund Ringvold, Øyeavdelingen, Ullevål sykehus,
Universitetet i Oslo.

Stipendiat Håvard Loftheim, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Post Doc Trine Grønhaug Halvorsen, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Forord

Først vil jeg rette en stor takk til Léon Reubsaet, Håvard Loftheim og Trine Grønhaug Halvorsen for svært god veiledning og faglige råd både under labarbeid og skriveprosess. Dere har alltid tatt tid til å hjelpe meg når jeg har lurt på noe.

Videre vil jeg takke Amund Ringvold for hans behjelpelighet ved anskaffelse av linsekapsler, gode innspill underveis og ikke minst raske tilbakemeldinger under sluttspurten.

Takk til alle ansatte og masterstudenter ved avdeling for legemiddelanalyse for et hyggelig og interessant år.

Til slutt vil jeg sende en takk til mamma og pappa for god støtte og oppmuntring gjennom hele studietiden og til venninnen min, Ellen, for gjennomlesing av oppgaven.

Oslo, mai 2010

Thanh-Tam Nguyen

Innholdsfortegnelse

INNHALDSFORTEGNELSE.....	4
1. SAMMENDRAG.....	8
2. FORKORTELSER	9
3. INNLEDNING OG HENSIKT	12
3.1 INNLEDNING	12
3.2 HENSIKT	13
4. TEORI.....	14
4.1 ØYETS ANATOMI.....	14
4.1.1 Ytre vevslag	14
4.1.2 Midterste vevslag.....	14
4.1.3 Indre vevslag	14
4.1.4 Synssansen.....	15
4.2 GRØNN STÆR (GLAUKOMA).....	16
4.2.1 Eksfoliasjonsglaukom.....	16
4.2.2 Eksfoliasjonsmaterial	17
4.2.3 Behandling ved grønn stær.....	17
4.3 LINSEKAPSEL.....	18
4.3.1 Vekst og tykkelse.....	18
4.3.2 Innhold i linsekapselen.....	19
4.4 EGENSKAPER TIL AMINOSYRER, PEPTIDER OG PROTEINER.....	20
4.5 PROTEOMIKK	21
4.5.1 Trypsin.....	22

4.5.2	<i>Biomarkør</i>	23
4.6	PRØVEOPPARBEIDELSE.....	23
4.6.1	<i>Fast-fase-ekstraksjon</i>	23
4.7	KROMATOGRAFI.....	24
4.7.1	<i>HPLC</i>	25
4.7.2	<i>Massespektrometer (MS)</i>	26
4.8	IDENTIFISERING AV PEPTIDIONER VED HJELP AV DATABASESØK.....	30
4.8.1	<i>MS</i>	30
4.8.2	<i>MS/MS</i>	31
4.9	MULTIDIMENSJONAL SEPARASJON	33
4.9.1	<i>2D-kromatografi</i>	33
4.9.2	<i>1.dimensjon - Hydrofil interaksjon væskekromatografi (HILIC)</i>	34
4.9.3	<i>Mobilfase</i>	35
4.9.4	<i>2.dimensjon-RPC</i>	36
5.	MATERIALER OG METODER	37
5.1	KJEMIKALIER, ANALYTTER OG DIVERSE UTSTYR	37
5.2	TILLAGING AV BUFFERE	40
5.2.1	<i>Tillaging av 20 mM maursyre</i>	40
5.2.2	<i>Tillaging av ammoniumbikarbonat 50 mM, pH ca 8</i>	40
5.2.3	<i>Tillaging ammoniumacetat 20 mM, pH ca 5.5</i>	40
5.2.4	<i>Tillaging av 0,1 % TFA-løsning</i>	41
5.3	TILLAGING AV MOBILFASER.....	41
5.3.1	<i>Mobilfaser til LC-MS</i>	41

5.3.2	<i>Mobilfaser til HILIC</i>	41
5.4	TILLAGING AV REAGENSER.....	41
5.4.1	<i>Tillaging av DL-Dithiothreitol 6,5 mM</i>	41
5.4.2	<i>Tillaging av Iodoacetic acid 54 mM</i>	42
5.5	TILLAGING AV PEPTIDLØSNINGER	42
5.5.1	<i>Tillaging av trypsinløsning 1 mg/mL</i>	42
5.5.2	<i>Tillaging av cytokrom c løsning 2 mg/mL</i>	42
5.6	LØSNINGER TIL SPE	42
5.6.1	<i>Selvlagede C18 SPE-tipper</i>	42
5.6.2	<i>Kommersielt SPE: OMIX</i>	42
5.7	LINSEKAPSLER FRA KU OG PASIENTER.....	43
5.7.1	<i>Linsekapsel fra ku</i>	43
5.7.2	<i>Linsekapsel fra pasienter med grå stær</i>	43
5.8	DIGEST MED TRYPSIN	44
5.8.1	<i>Prosedyre for in-gel metode 1 og 2</i>	45
5.8.2	<i>Prosedyre for in-solution metode 1 og 2</i>	45
5.9	SPE	47
5.9.1	<i>Tillaging av SPE-tip</i>	47
5.9.2	<i>Prosedyre for SPE</i>	47
5.9.3	<i>Fortynning av prøve før fast-fase-ekstraksjon</i>	49
5.10	1. DIMENSJON-HILIC	50
5.10.1	<i>Inndamping</i>	50
5.11	2. DIMENSJON-RPC	51

5.12	IDENTIFISERING AV PROTEINER.....	54
6.	RESULTATER OG DISKUSJON	55
6.1	INNLEDENDE FORSØK	55
6.1.1	<i>Cytokrom c klipp i nærvær med linsekapsel fra ku.</i>	<i>55</i>
6.1.2	<i>Valg av SPE</i>	<i>57</i>
6.1.3	<i>Bestemmelse av mengde ABC-buffer som tilsettes før SPE</i>	<i>60</i>
6.2	ANALYSE AV LINSEKAPSLER MED 1D-RPC.....	63
6.2.1	<i>Antall peptidtreff for in-gel metode 1 og in-solution metode 1</i>	<i>65</i>
6.3	ANALYSE AV LINSEKAPSLER MED 2D-HILIC-RPC.....	66
6.3.2	<i>Sammenligning av 2D-HILIC-RPC med 1D-RPC</i>	<i>68</i>
6.4	ENDRING AV PRØVEOPPARBEIDELSE	69
6.5	ANALYSE AV PASIENTPRØVER.....	73
7.	KONKLUSJON	78
8.	KILDELISTE.....	79
9.	VEDLEGG	82
9.1	KROMATOGRAMMER FOR ANALYSE AV LINSEKAPSLER.....	82
9.2	FORSØK MED 2D-HILIC-RPC.....	83
9.3	ANALYSE AV PASIENTPRØVE.....	87

1. Sammendrag

Eksfoliasjonsglaukom som er en undergruppe til grønn stær, er karakterisert ved at det dannes eksfoliasjonsmateriale i fremre del av øyet. Eksfoliasjonsmaterialet er ofte assosiert med at ciliarepitelet, zonulatråder og irisepitelet taper sin funksjon, samt at kammervannets drenering blir blokkert. Derved kan det intraokulære trykke øke.

Hensikt med oppgaven var å identifisere proteiner i eksfoliasjonsmaterialet slik at proteinene kan anvendes som biomarkører. Det brukes bare pasientprøver med grå stær fordi pasienter med grønn stær beholder linsekapselen ved operasjon. Ved operasjon for grå stær fjernes den fremre delen av linsekapselen for å muliggjøre implantasjon av kunstig linse [1].

I innledende forsøk ble det brukt prøvemateriale fra linsekapsel hos ku. To metoder ble testet for å få proteinene i prøven trypsinert til peptidprodukter, såkalt in-gel metode og in-solution metode. Siden in-gel metode innebar en del vasketrinn og størrelsen på pasientprøven var vesentlig mindre enn linsekapsler fra ku ble det valgt å bruke en enkel in-solution trypsinering.

Pasientprøver med eksfoliasjonsmaterialet og pasientprøve uten eksfoliasjonsmaterialet har enkelte fellesproteiner som for eksempel vimentin, kollagen og glykoproteinet laminin. Disse er substanser som opprettholder formen og funksjonen til linsekapselen. Det ble også funnet proteiner som kun pasienter med eksfoliasjonsmaterialet har som for eksempel apolipoprotein e, enzymene fosfoglycerat kinase og 6-fosfogluconat dehydrogenase og annexin II.

Det har bare blitt analysert fire pasientprøver til sammen. Det kreves flere analyser av pasienter for å si at proteiner som bare forekommer hos de pasienter med eksfoliasjonsmaterialet skal ha en klinisk verdi.

Resultatet viser at anvendelse av in-solution og LC-MS/MS at proteiner i pasientprøver ble spaltet med trypsin til peptidprodukter.

2. Forkortelser

μL	Mikroliter
μM	Mikrometer
1D	One-dimensional, endimensjonal
2D	Two-dimensional, todimensjonal
ABC	Ammoniumbikarbonat
ACN	Acetonitril
CID	Collision induced dissociation, kollisjon induisert fragmentering
Da	Dalton, enhet for molekylvekt
Digest	Proteolyse, klipping av peptidbindinger
DTT	DL-Dithiothreitol
ES	Eksfoliasjonsmaterial
ESI	Electrospray ionization, elektrosprayionisering
g	Gram
HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, hydrofil interaksjon kromatografi
IAA	Iodoacetic acid
IOP	Intraocular pressure, intraokulær trykk
kV	Kilovolt
LC	Liquid Chromatography, væskekromatografi
L	Liter
Missed cleavages	Ufullstendig klipp
mBar	Millibar
mg	Milligram
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MS	Mass spectrometry, massespektrometri

MS/MS	Tandem Mass Spectrometry, tandem massespektrometri
m/z	Forhold masse/ladning
NH ₄ Ac	Ammoniumacetat
nm	Nanometer
ppm	Parts per million
RPC	Reversed phase chromatography, omvendt-fase-kromatografi
Rpm	Revolutions/rounds per time, risteastighet
sek	Sekunder
SIM	Selected ion monitoring, selektiv ionemonitorering
SPE	Solid-Phase Extraction, fast-fase-ekstraksjon
TFA	Trifluoroacetic acid, trifluoroeddiksyre
UV	Ultrafiolett
v/v	Volumprosent
ZIC-HILIC	Zwitterionic Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, Zwitterionisk Hydrofil Interaksjon Væskerkromatografi
A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsyre
E	Glutaminsyre
F	Fenylalanin
G	Glysin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Metionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin

R	Arginin
S	Serin
T	Treonin
V	Valin
W	Tryptofan
Y	Tyrosin

3. Innledning og hensikt

3.1 Innledning

Grønn stær har en rekke undergrupper hvorav simplex glaukom og eksfoliasjonsglaukom forekommer oftest. Felles for disse undergruppene er at sykdommen kan føre til blindhet, fordi nerver og blodårer ødelegges irreversibelt over tid hvis sykdommen ikke blir oppdaget raskt nok. Hovedfokus i denne oppgaven er eksfoliasjonsglaukom som er karakterisert ved at det gradvis dannes eksfoliasjonsmateriale i fremre del av øyet. Eksfoliasjonsmaterialet endrer enkelte strukturer i øyet slik at normalfunksjonen avtar, spesielt kan det medføre økt avløpsmotstand for drenering av kammervann og følgelig økt trykk i øyet. Forekomst av eksfoliasjonsglaukom øker med alder, og det er sjeldent at det forekommer før 50-årsalderen [1].

Enkelte pasienter med grå stær har i tillegg eksfoliasjon i øyet. En liten del av fremre linsekapsel fjernes ved operasjon, og denne delen brukes som prøvemateriale i denne oppgaven. Årsaken til at det ikke brukes linsekapsler fra pasienter med grønn stær for å undersøke proteininnholdet i eksfoliasjonsmaterialet er at disse gjennomgår en annen type operasjon som innebærer at de kan beholde sine linsekapsler.

Undersøkelsene i dette arbeidet er basert på linsekapsler fra pasienter med grå stær både med og uten eksfoliasjonsmateriale. Identifisering av biomarkører i eksfoliasjonsmaterialet kan brukes til å oppdage sykdom ved et tidlig stadium og forbedre terapikontroll [2]. For å karakterisere eksfoliasjonsmaterialet anvendes LC-MS/MS.

3.2 Hensikt

Det var ønskelig å finne en egnet prøveopparbeidelse for uttak av proteiner fra linsekapsel bestående av ca 90 % kollagen. Hovedutfordring i denne oppgaven var derfor å finne en egnet prøveopparbeidelsesmetode for linsekapsler som gjør det mulig å spalte proteiner til peptidprodukter. Dette var nødvendig for å kunne karakterisere innholdet av eksfoliasjonsmateriale i linsekapsel ved hjelp av LC-MS/MS. En LC-MS/MS metode for analyse av proteiner i linsekapselen ble forsøkt utarbeidet. Videre skal metoden testes på pasientprøver for å sjekke om det er karakteristiske forskjeller mellom pasienter med grå stær med og uten eksfoliasjonsmateriale i linsekapselen.

4. Teori

4.1 Øyets anatomi

Lysinntrykk blir i øyet omdannet slik at man får dannet et bilde av omgivelsene.

Synsorganet består av øyet, synsnerven og synsbanene. Øyets oppbygning illustreres i Figur 1.

4.1.1 Ytre vevslag

Øyeeplet består ytterst av sclera. Det er en ugjennomsiktig kraftig senehinne som virker beskyttende mot uønsket indre og ytre påvirkninger. Blodforsyninger får den via episclera som ligger utenpå. I fremre del av øyet går sclera over i kornea. Kornea er gjennomsiktig med fem forskjellige vevslag. Den har ikke blodårer, og får næring gjennom tårevæsken og kammervæsken. Siden kornea er gjennomsiktig, blir mindre enn 1 % av lyset reflektert [3].

4.1.2 Midterste vevslag

Uvea er det midterste laget i øyet. Den har som oppgave å forsyne øyet med blod.

Uvea består av tre deler: choroidea (årehinnen), som forsyner retina med næringsstoffer, corpus ciliare (ciliarlegemet), som produserer kammervann og bestemmer linsens krumning og iris (regnbuehinnen), som styrer hvor mye lys som kommer inn i øyet ved å variere pupillens størrelse [3].

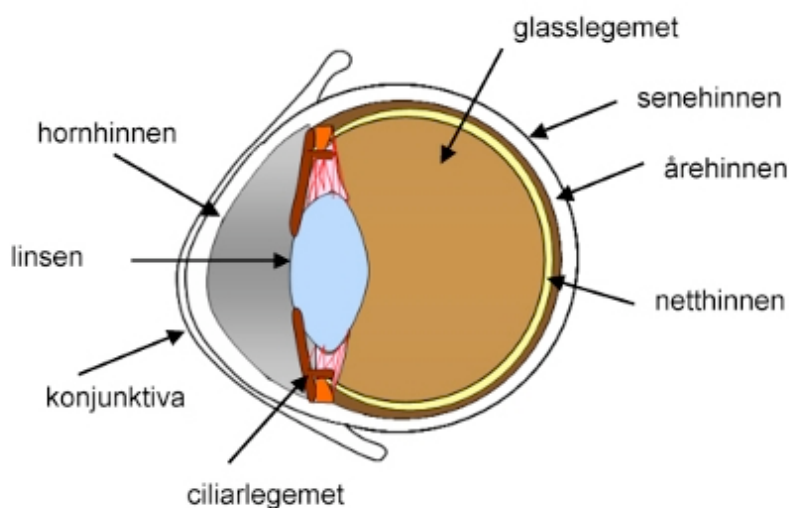
4.1.3 Indre vevslag

Linsen deler øyeeplet i to, den fremste delen med linsen og hornhinnen inneholder også kammervann, mens den bakerste delen utgjøres av glasslegemet. Kammervann forsyner linsen og hornhinnen med næring og fjerner avfallsstoffer. Produksjonen foregår i ciliare epitelium. Kammervæsken strømmer via pupillen til området mellom regnbuehinnen og hornhinnen. Dreneringen skjer via et poresystem, (trabekelverket)

til Schlemms kanal som er en sirkulær kanal som ligger mellom hornhinnen og senehinnen. Det er denne balansen mellom produksjon og drenering av kammervæsken som opprettholder formen og trykket i øyet. Linsen er et bikonvekst transparent legeme, den har en fremre og en bakre pol. Linjen mellom disse kalles for linseaksen. Linsens omkrets i frontalplanet kalles ekvator. Linsen er festet ved ekvator til zonulatråder som igjen er festet til ciliarlegemet. Linsen består av tre vevslag; linsekapsel, linseepitel og stroma [3].

4.1.4 Synssansen

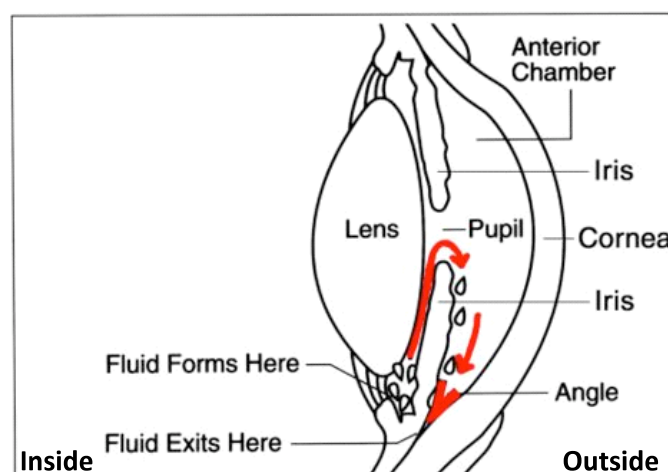
Retina (netthinnen) består av flere cellelag som dekker $\frac{3}{4}$ av øyeeplets innside. Den ytre delen av retina består av pigmentepitel som beskytter sansecellene for sterkt lys, mens den indre delen består av støtteceller, nerveceller og sanseceller. Det er to typer sanseceller, staver og tapper. Stavene registrerer lys og bevegelse, mens tappene sørger for fargesyn. I retina omdannes lysenergi til elektrisk energi som ledes videre gjennom synsbanen til synssentret i hjernebarken. Sansecellene registrerer bølgelengder fra ca 380 nm til 750 nm innen det elektromagnetiske feltet [3].



Figur 1: Øyets oppbygning [4].

4.2 Grønn stær (glaukoma)

Grønn stær er en sykdom som fører til skader på synsnerven og svekket syn, skaden på synsnerven er irreversibel. Det vanligste er at det oppstår økt trykk i øyet, det intraokulære trykket (IOP). Ganglioncellene i netthinnen gjennomgår en apoptose slik at overføring av signaler til hjernebarken svekkes. Kammervann produseres på corpus ciliare og ledes bort på forsiden av regnbuehinnen, (se Figur 2). Normalt er det en likevekt mellom produksjon og drenering av kammervann. Når det oppstår en ubalanse ved at dreneringen er tett, hopper det seg opp med kammervann som forårsaker at trykket i øyet stiger. Grønn stær kan også forekomme ved normalt trykk, ofte forårsaket av nedsatt blodtilførsel [5]. Det finnes derfor flere forskjellige varianter av grønn stær, men hovedoppgaven baserer seg på eksfoliasjonsglaukom som er beskrevet under.



Figur 2: Viser kammervannets strøm gjennom øyet. Venstre delen av figuren er øyets innside og høyre delen av figuren er øyets utside [6].

4.2.1 Eksfoliasjonsglaukom

I litteraturen blir eksfoliasjonsglaukom også omtalt som pseudoeksfoliasjonsglaukom og kapselglaukom [1]. Pasienter som har eksfoliasjonssyndrom har stor sannsynlighet

for å utvikle åpen vinkel glaukom. Forskjellen mellom eksfoliasjonsglaukom og primær åpen vinkel glaukom er at det først nevnte har mer aggressiv sykdomsprogresjon og dårligere sykdomsprognose [7]. Eksfoliasjonssyndrom kan være arvelig, og forekommer sjeldent hos pasienter under 50 år.

Eksfoliasjonsglaukom kjennetegnes ved at pasienten har et gråhvitt material og pigmentforandringer i linsekapselen, regnbuehinnen, zonulatrådene, ciliarlegemet og pupillen. Disse forandringene kan føre til økt intraokulær trykk ved at eksfoliasjonsmaterialet tetter igjen drenasjen av kammervæsken [8].

4.2.2 Eksfoliasjonsmaterial

Ved å bruke elektronmikroskopi og immunhistokjemi har det vist seg at eksfoliasjonsmaterialet består av to komponenter, en trådformet del og en strukturløs del. Den trådformete delen viser et identisk mønster ved forskjellige lokalisasjoner og gir et karakteristisk bilde ved bruk av elektronmikroskopi, mens den strukturløse delen varierer mellom lokalisasjonene og komponenten kan kun identifiseres med immunhistokjemi. Eksfoliasjonsmaterialet er ofte assosiert med degenerative forandringer i ciliarepitelet, zonulaområdet og irisepitelet. Disse taper sin normalfunksjon ved at eksfoliasjonsmaterialet tar over [1].

4.2.3 Behandling ved grønn stær

Grønn stær blir ofte oppdaget ved rutinekontroll fra 50-årsalderen. Tilstanden er asymptomatisk og pasienter merker sjeldent ubehag eller smerter før det har blitt store skader på synsnerven. Sen diagnose øker risikoen for irreversibelt synstap. Ved påvist grønn stær finnes ulike behandlinger som legemidler, laser eller kirurgi. Målet for behandlingen er å bremse sykdommen, og behandlingen er avhengig av sykdomsgraden, og hvor mye det okulære trykket ønskes redusert. Aktuelle medikamenter er blant annet øyedråper som kan redusere kammervæskeproduksjonen som karboanhydrasehemmere og betablokkere, og økt kammervæskedrenasje med prostanglandinanaloger. Medikamentene gis både som monoterapi og i

kombinasjonsbehandling. Med laser lages det små porer i Schlemms kanal slik at drenering av kammervæsken økes [9]. Ved kirurgi lages det et kunstig avløp for å øke dreneringen.

4.3 Linsekapsel

Linsekapsel er en basalmembran rundt linsen som virker beskyttende mot vev, virus og bakterier. Spenningen i kapselen og trykket i linsen, gjør at linsen kan endre form for å øke brytningskraften (akkommodasjon). Det er zonulatrådene som holder linsen på plass, når ciliarmusklene kontraheres, slakkes zonulatrådene og formen på linsen forandres fra ellipse til kuleform. Zonulatrådene er festet til linsens overflate på tre forskjellige steder, fremre, ekvatorialt og bakre del på linsen [3, 10].

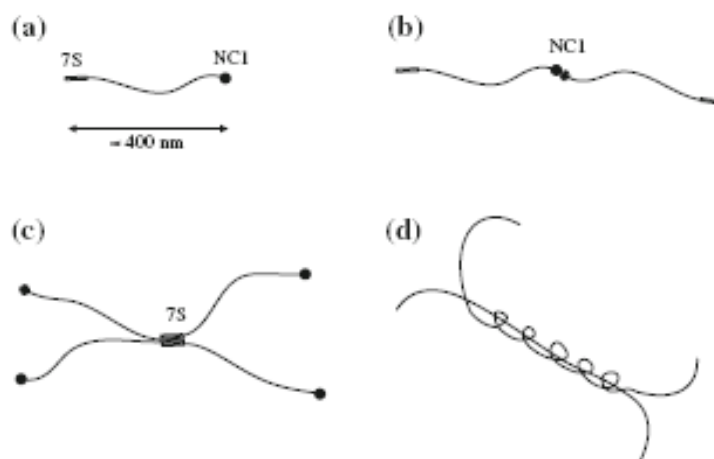
I tillegg til at linsekapselen er med på å opprettholde akkommodasjonen tillater linsekapselen penetrasjon av næring og avfall til og fra linsen. Små molekyler som glukose, vann, oksygen og karbondioksid fra kammervannet diffunderer gjennom linsekapselen til linsen. Linsekapselen er også selektivt permeabel for molekyler som kreves til utviklingen av linsen. Det dannes også proteiner for å opprettholde øyets homeostase. Hastigheten på diffusjonen blir påvirket av størrelse og ladning til molekylene [10, 11].

4.3.1 Vekst og tykkelse

Kapselen vokser gjennom hele livet i takt med at linsen vokser. Den fremre delen av kapselen blir produsert av epitelceller, derfor blir kapselen påvirket av epitelcellens avtagende aktivitet ved økt alder. Utviklingen av den bakre delen av kapselen er mer diffust, men en hypotese er at den stammer fra epitelceller i den første fasen av livet [10]. Tykkelsen på kapselen er vekslende, den er tykkest perifert foran og bak ekvator der zonulatrådene er festet. Tykkelsen ved fremre delen vokser med alder, mens den bakre delen av kapselen synes å være konstant. Tykkelsen varierer fra 3 μm til ca 20 μm [10, 11].

4.3.2 Innhold i linsekapselen

Linsekapselen er den tykkeste basalmembranen i kroppen [10]. Den består av parallelle lameller som er tett bundet til hverandre, og dette gjør at den er homogen og tettpakket. Strukturen avtar med alderen. Den ekstracellulære matriksen består av type IV kollagen som interagerer med glycoproteiner (laminin), proteoglykaner, entacin/nidogen og agrin. Disse enhetene er sammen med på å øke stabiliteten og formen på linsekapselen. Type IV kollagen molekylet har en ende som er en aminoterminal (7S) mens den andre enden består av karboksylterminal (NC1). I midten er det en trippel heliksdel bestående av glysinrepetisjoner, et langt og fleksibelt molekyl som kan interagerer med andre molekyler. Den ekstracellulære matriksen er bygget opp av tre forskjellige interaksjoner; to kollagenmolekyler er hektet sammen ved aminoterminal enden, fire kollagenmolekyler som er bundet sammen ved karboksylterminal enden, og det siste er midtpartiet som kveiler seg sammen med flere andre kollagenmolekyler [12], (se Figur 3). Nettverket kan sammenlignes med 2D heksagonal nettverk, og mange lag med dette nettverket utgjør tykkelsen i kapselen.



Figur 3: Illustrasjon på kollagen IV interaksjoner. a) 7S og NC1 på et kollagenmolekyl, b) binding ved NC1 c) fire kollagenmolekyler som er hektet sammen ved 7S og d) kollagenmolekyler som er kveilet sammen.

4.4 Egenskaper til aminosyrer, peptider og proteiner

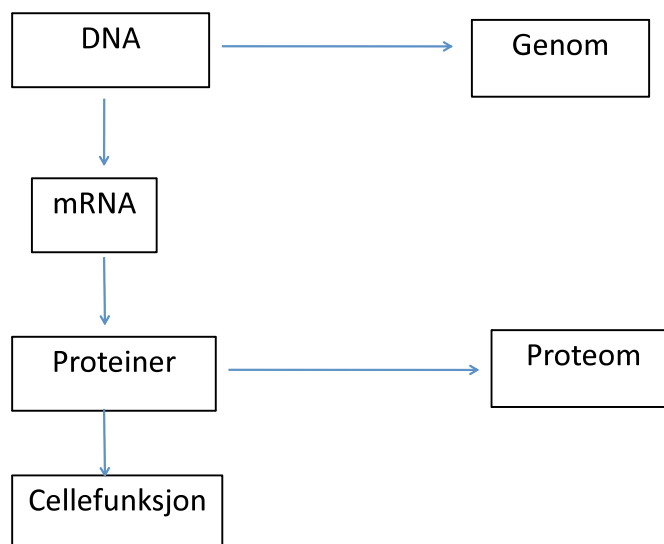
Proteiner er de mest vanligste biologiske makromolekyler som eksisterer i alle celler og alle deler av cellene. Proteiner består av aminosyrer som er kovalent bundet til hverandre i lineære sekvenser. I alt finnes det 20 forskjellige aminosyrer. Alle aminosyrene har en felles grunnstruktur som er karboksylgruppe, aminogruppe og sidekjede bundet til et karbonatom, dette karbonatomet kalles α -karbonatom. Sidekjeden kan variere i størrelse, struktur og ladning som gjør at aminosyrene har forskjellige egenskaper. Siden de har ulike egenskaper er det mulig å separere dem ved kromatografisk teknikk. Aminosyrene kan klassifiseres sidekjedene på følgende måte:

- **Upolar og alifatisk:** Glysin, Alanin, Prolin, Valin, Leucin, Isoleucin, Metionin
- **Aromatisk:** Fenylalanin, Tyrosin, Tryptofan
- **Polar og uladet:** Serin, Treonin, Cystein, Asparagin, Glutamin
- **Basisk:** Lysin, Arginin, Histidin
- **Sur:** Asparaginsyre, Glutaminsyre

Vann blir avspaltet ved dannelsen av peptidbindinger og reaksjonen kalles kondensasjonsreaksjon. Aminosyrene kan binde seg i mange ulike rekkefølger som gir forskjellige kombinasjoner, og lengden på kjeden avgjør om det kan kalles for peptid eller proteiner. Enden av aminosyrekjeden som har en fri aminosyregruppe kalles for N-terminal mens den andre enden som har en fri karboksylgruppe kalles for C-terminal. Proteinstrukturen inndeles i forskjellige nivåer. Primærstrukturen viser aminosyresekvensen som er bundet sammen via peptidbindinger og disulfidbindinger, sekundærstrukturen beskriver konformasjonen til polypeptidet. Noen typer sekundærstrukturer forekommer oftere enn andre, for eksempel α -heliks og β -flak. Tertiærstrukturen er en beskrivelse av polypeptidkjeden dimensjonalt. Kvarternærstruktur beskriver flere polypeptidkjeder som går sammen og danner et proteinkompleks [13].

4.5 Proteomikk

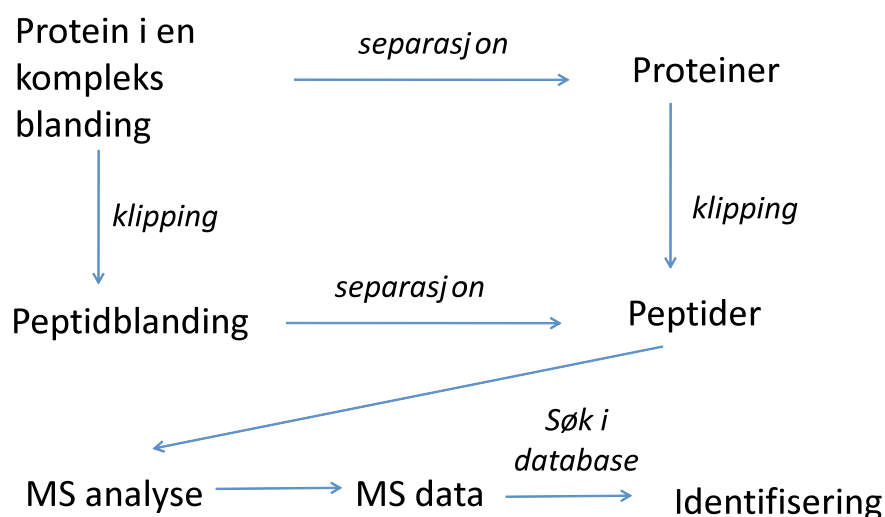
Proteomikk er studien om alle proteiner som utgjør proteomet, det vil si alle proteiner som et genom koder for. Genomet inneholder den totale genetiske informasjonen i en organisme. Alle organismer har et genom, men flere proteomer [14]. I motsetning til genomet er proteomet dynamisk. Analyse av proteomet kan derfor anses som et øyeblikksbilde siden proteomet hele tiden blir påvirket av faktorer som for eksempel næring, temperatur og legemiddelbehandling [15]. Proteomikk brukes ved identifikasjon, kvantifisering, bestemmelse av proteinets lokalisasjon, modifisering, interaksjon, aktiviteter og deres funksjon [16], (se Figur 4).



Figur 4: Biokjemisk kontekst av genomikk og proteomikk [11].

Proteomikk har fire hovedforskningsområder. Det første består i å identifisere hele proteomet. Det andre er å identifisere proteiner ved forskjellige modifikasjoner for eksempel proteinprøver som blir utsatt for kjemikalier, legemidler eller fysisk stimulus. Det tredje området er å forske på hvordan proteinene interagerer med hverandre, og det fjerde området konsentrerer seg om hvor mye proteinet blir uttrykt. Identifisering av proteiner er bygget på at de fleste peptidsekvenser på seks eller flere aminosyrer er unike i proteomet til en organisme. Ved bestemmelse av

peptidsekvensen eller måling av massen er det mulig å identifisere proteinet som peptidsekvensen stammer fra. Proteomikkanalyse starter som oftest med proteiner i en kompleksblanding som består av intakte proteiner av ulik molekylvekt, modifiseringer og løselighet. For å oppnå peptidsekvenser må proteiner spaltes til peptider ved hjelp av en protease som for eksempel trypsin. Etter prøveopparbeidelsen analyseres det på massespektrometri. Data fra massespektrometri sammenlignes opp mot databaser for å identifisere peptidfrekvensen [14], (se Figur 5). Det finnes mange søkemotorer, den som ble brukt i oppgaven var SEQUEST i Proteome discoverer som blir mer beskrevet i kapitel 4.8.



Figur 5: Generelt skjema for proteomikk analyse [11].

4.5.1 Trypsin

Ved identifikasjon av proteiner er det vanlig å bruke en protease som for eksempel trypsin til å spalte proteinet til mindre peptidprodukter. Årsaken er at det er vanskelig å identifisere nøyaktig masse til proteiner på grunn av størrelsen, samt redusert sensitivitet på grunn av ladningsfordeling ved bruk av ESI. Trypsin er stabilt under mange forskjellige forhold, noe som gjør at den er velegnet til spalting av proteiner.

Enzymet spalter opp aminosyrekjeder på C-terminalsiden av arginin og lysin, det spaltes ikke hvis prolin er neste aminosyre [17]. Peptidene får en lengde som er kompatibel for MS-deteksjon. Selv om trypsin er spesifikk kan det forekomme at den spalter andre steder enn antatt og at den ikke utfører klipping etter aminosyrene lysin og arginin dette kan være på grunn av proteinets komplekse struktur som forhindrer tilgjengeligheten til trypsin. Dette fører igjen til at peptidene blir større og færre enn antatt, det oppstår såkalt ”miss cleavage”. Det finnes ulike måter å identifisere proteiner basert på peptidsekvenser. Anvendelse av peptidmassefingeravtrykk baserer seg på massene til peptidene målt med massespektrometri som sammenlignes med teoretisk massespektrometri hvor proteiner er blitt spaltet til peptider med samme protease som brukes eksperimentelt. En mer nøyaktig metode er å benytte fragmenter fra MS/MS-data som sammenlignes med teoretiske peptidfragmenter i databaser. [18]. Databasesøk er beskrevet mer detaljert i kapittel 4.8.

4.5.2 Biomarkør

Proteomikk kan brukes som et verktøy for å sammenligne proteomet fra en frisk tilstand mot proteomet fra en patologisk tilstand. Eventuelle forskjeller kan gi antydning på forekomst av såkalte biomarkører. Forekomst eller fraværende mengde av ulike proteiner kan være relatert til patologien og proteinene kan være potensielle biomarkører. Analyse av disse biomarkørene kan gi et bilde av prognose av sykdom, sykdomsprogresjonen eller forløpet av legemiddelbehandling [2, 15].

4.6 Prøveopparbeidelse

4.6.1 Fast-fase-ekstraksjon

Fast-fase-ekstraksjon (SPE) brukes til å isolere, rense og konsentrere stoffer fra væsker. Prinsippet går ut på stoffers egenskap til å fordele seg mellom stasjonærfasen (sorbenten) og væskefasen. Sorbenten bør bestå av funksjonelle grupper som interagerer med analytten mens forurensninger vaskes ut. Når interaksjonen mellom

sorbenten og analytten i prøven er større enn interaksjonen mellom væsken og analytten, vil analytten retarderes på overflaten av sorbenten, og forurensninger separeres fra analytten. Omvendt-fase-ekstraksjon brukes for å ekstrahere upolare stoffer fra vandige prøveløsninger [19].

Det utføres gjerne en fire trinns prosedyre:

1. *Kondisjonering*: Fukting av sorbenten og økning av det aktive overflatearealet. Dette er med på å bedre kontakten mellom analytten og sorbenten. Det brukes høy løsemiddelstyrke som deretter må denne fjernes med en lavere løsemiddelstyrke før prøven kan påsettes.
2. *Prøvepåsetting*: Prøven adsorberes på overflaten til sorbenten. Målet er at analytten interagerer mer med sorbenten enn det forurensninger gjør. Prøveløsningen bør ha svak elueringsstyrke.
3. *Vask*: Fjerner forurensninger som også er adsorbent til sorbenten, men som er svakere bundet. Bør vaskes med elueringsstyrke som ikke altfor høy siden analytten kan vaskes ut.
4. *Eluering*: Bruker løsemiddel som kan bryte mellom analytten og sorbenten. Det optimale er å velge en høy nok elueringsmiddel slik at volumet er lite og det unngås fortynning av prøven [19].

4.7 Kromatografi

Kromatografi brukes til å separere stoffer fra hverandre. Stoffene fordeler seg mellom en stasjonærfase og en mobilfase. I denne oppgaven ble det brukt væskechromatografi. Det vil si at væsken som er i bevegelse tar med seg stoffene over til stasjonærfase. Avhengig av interaksjonen mellom analytten og stasjonærfasen vil stoffene retarderes i forskjellige grad, og som følge av dette, kommer de ut til forskjellige tidspunkter fra kolonnen.

Ulike separasjonsprinsipper anvendes i væskekromatografi, i denne oppgaven ble omvendt-fase-væskekromatografi brukt. *Omvendt-fase- væskekromatografi* baserer seg på hydrofobe interaksjoner, spesielt er det van der Waalske krefter mellom analytt og stasjonærfasen som spiller inn. Da er stasjonærfasen hydrofob, mens mobilfasen er vandig løsning. *Stasjonærfasen* er som oftest silikabaserte med ulike karbonkjeder, de vanligste som anvendes er C4-, C8- eller C18-materiale. Jo lengre karbonkjeder, jo høyere hydrofobisitet.

Mobilfasen består av blandinger av vann og organiske løsemidler (metanol, acetonitril eller tetrahydrofuran). Blandingsforholdet mellom disse bestemmer styrken til mobilfasen som gjør at den kan bryte interaksjonene mellom stasjonærfasen og analytten slik at stoffene kan elueres ut. Høyt innhold av organiske løsemidler, øker styrken og retensjonen avtar. pH til mobilfasen bør være mellom to og åtte. Ved pH lavere enn to kan de funksjonelle gruppene spaltes av i silikabaserte kolonner, mens ved pH høyere enn åtte vil silika løses opp [19].

4.7.1 HPLC

HPLC-systemet består av to mobilfasereservoarer, pumper for hver av mobilfasene, degasser, autoinjektor, kolonne og detektor. Pumpene pumper mobilfasene inn i et blandekammer slik at de blandes sammen i ulike forhold og endringen av sammensetningen fører til en gradienteluering over kolonnen. Prøven blir som oftest injisert når løsemiddelstyrken i mobilfasen er lav. Etter hvert økes den organiske styrken og polariteten på mobilfasen minker. Det kan kjøres en kombinasjon av isokratisk eluering og gradienteluering for å få en bedre separasjon samtidig som elueringstiden blir forkortet [19]. For å unngå luft i systemet som igjen fører til ujevn væskehastighet, brukes det degasser.

4.7.2 Massespektrometer (MS)

Når det brukes massespektrometri som detektor i et LC-MS system er det viktig at mobilfasen kun inneholder flyktige komponenter for å unngå dannelsen av salter i ionekilden som igjen fører til tetting av kapillæret i massespektret.

Massespektrometer omdanner komponenter i blanding til ioner som blir separert etter masse over ladning (m/z). MS består i hovedsak av ioniseringskilde, masseanalysator og detektor.

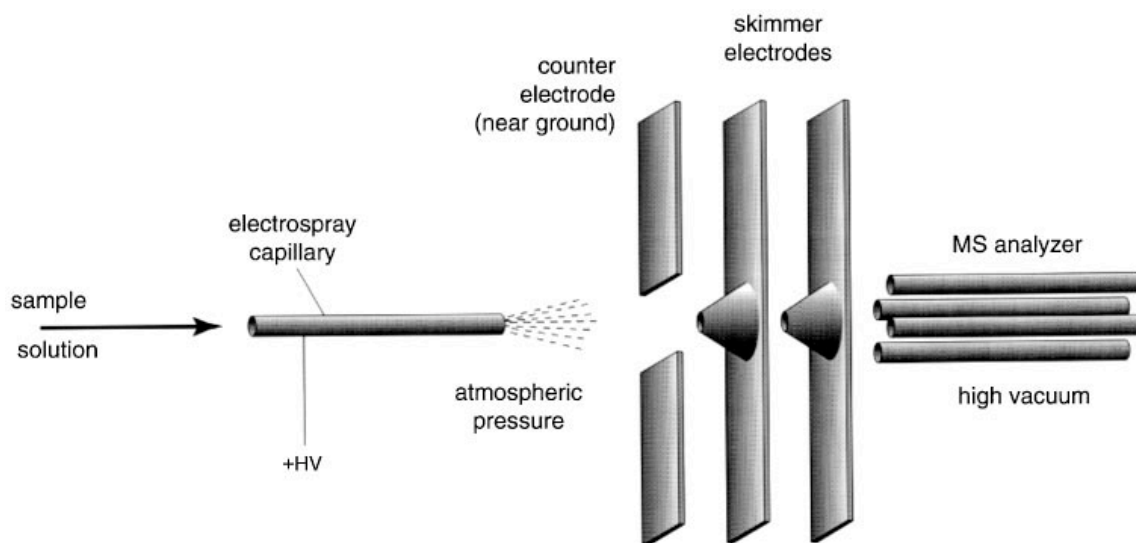
IONEKILDE → MASSEANALYSATOR → IONETDETEKTOR

Elektrosprayionisasjon

Det finnes flere typer ioniseringsteknikker som anvendes: Atmosfæretrykk-kjemisk-ionisasjon blir mest brukt ved upolare molekyler som ikke lar seg ionisere for eksempel steroider. Elektrosprayionisasjon (ESI) brukes ved sure eller basiske forbindelser. Det ble brukt ESI i denne oppgaven.

Mobilfasen fra HPLC føres inn til et tynt kapillærrør ved inngangen av ESI. Ved utgangen forstøves væsken med nitrogen-gass, og det dannes dråper av både analytt og løsningsmidler. Det er en spenningsforskjell (vanligvis mellom 3-5 kV) mellom inngang og utgang slik at dråpene får elektrisk ladning. Avhengig av polariteten av spenningen får dråpene enten positiv eller negativ ladning. Proteiner og peptider har som oftest positiv ladning fordi mobilfasen som brukes har lav pH som fører til at de basiske gruppene på aminosyreterminalen og sidekjedene vil foreligge i protonert form. Det brukes derfor positiv mode. Ved utgangen av kapillærrøret er det en strøm av tørkegass, det vil si nitrogen-gass som gjør at dråpene blir mindre siden løsningsmidlet blir fjernet fra analytten. Løsningsmidlet som er flyktig vil etter hvert fordampe og spyles ut, frastøtningsspenningen øker og det fører til en Coulombeksplosjon av dråpene som videre fører til dannelsen av høy ladete små mikrodåper. Når det oppnås emisjon fra dråpene vil analyttionene ved hjelp av

elektrisk spenning dyttes inn i masseanalysatoren [20-22]. Figur 6 illustrerer oppsettet til ESI.



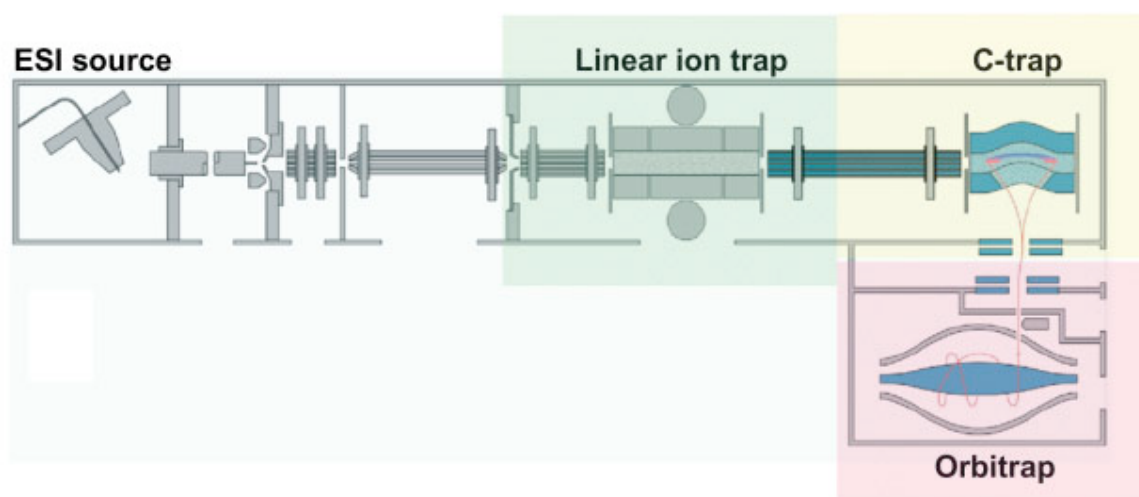
Figur 6: Illustrasjon av ESI [23].

Masseanalysator

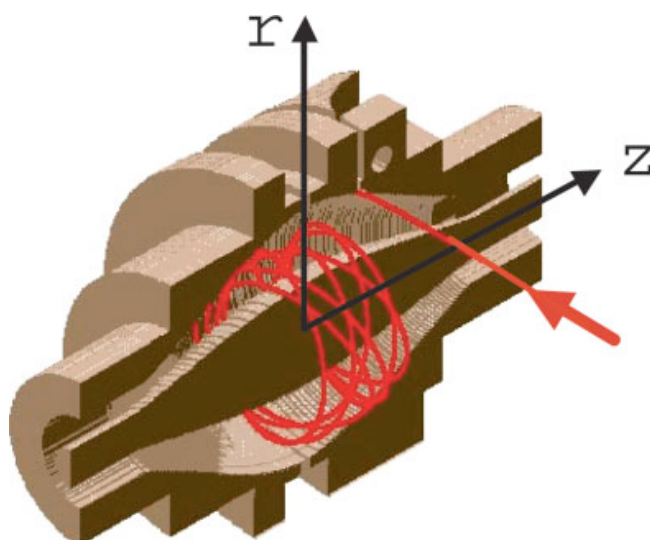
I masseanalysatoren blir ionene som kommer fra ESI separert masse over ladning (m/z). Når det legges inn et ekstra masseanalysetrinn etter den første analysen, kalles det MS/MS. Da utføres først seleksjon av masser, deretter fragmentering og tilslutt analyse av fragmentationene. Det finnes flere forskjellige masseanalysatorer som blir brukt innen LC-MS/MS. I denne oppgaven ble det brukt LTQ orbitrap. LTQ orbitrap har ekstrem høy oppløsningsevne, en massenøyaktighet på mindre enn 2 ppm for analyse av komplekse peptidblandinger [24].

LTQ orbitrap består hovedsakelig av tre hoveddeler: Lineær ionefelle, c-felle og orbitrap, (Figur 7 illustrerer rekkefølgen). Fra ESI entrer ionene først til den lineære ionefellen. Den lineære ionefellen består av fire parallelle stenger med vekselspenning i begge endene. Dette gjør at ionene holdes igjen, de blir både isolert og kan bli fragmentert. Sammenliknet med ionefellen har den lineære ionefellen

større lagringskapasitet som gir høyere sensitivitet [25]. Men den lineære ionefellen har lavere oppløsning og massenøyaktighet sammenlignet med orbitrap. Det er også forskjellige vakuumbetingelser mellom disse, orbitrap opererer med 10^{-10} mBar mens den lineære ionefellen opererer med 10^{-6} mBar. Når det er høyt nok antall ioner som akkumuleres i den lineære ionefellen, endres spenningen i enden og ionene overføres aksialt til c-fellen. C-fellen fungerer som ionelager før ionene pulserende overføres til orbitrap. Orbitrap består av en indre sentral elektrode, en ytre elektrisk isolert elektrode og to enkaps elektroder. Det er stor spenningsforskjell mellom ytre og indre elektrode og derfor blir ionene holdt inne i orbitrap. Det er en balanse mellom elektrostatisk tiltrekning mot sentral elektrode og sentrifugalkraften. På grunn av dette beveger ionene seg frem og tilbake i et bestemt spiralformet mønster i z-aksen til den indre elektroden, (Figur 8 illustrerer hvordan orbitrap ser ut innvendig). Frekvensen til denne bevegelsen lar seg måle på utsiden av orbitrap. Denne frekvensen er omvendt proporsjonal med m/z -verdien til ionet. En fourier transform tolker oscillasjonen til ionene med forskjellige masser til nøyaktige m/z -verdier [24, 26, 27].



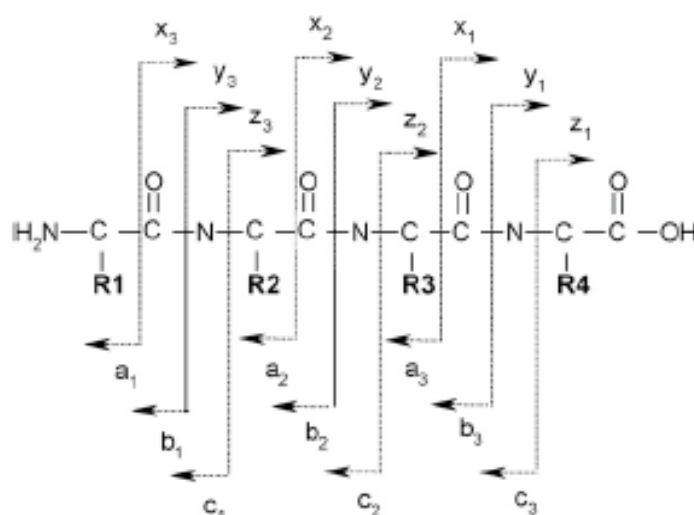
Figur 7: Skjematisk illustrasjon av LTQ Orbitrap [24].



Figur 8: Illustrerer hvordan orbitrap ser ut innvendig [26].

Fragmentering av peptidioner

Fragmenteringen foregår i den lineære ionefellen. m/z – verdier av interesse som blir målt ved hjelp av orbitrap, blir isolert og fragmentert i den lineære ionefellen ved hjelp av collision-induced dissociation (CID). Den kinetiske energien som peptidionene tar til seg når de kolliderer med inert gass medfører til fragmentering. Den vanligste kløyvingen skjer mellom karbonyloksygenet og amidnitrogenet, det danner y- og b-ioner. Fragmentet blir kalt y-ion når det er positiv ladning på C-terminalen, og b-ion når det er positiv ladning på N-terminalen. Den andre halvdel blir et nøytralt fragment. Det er også mulig å bryte andre bindinger på grunnskjelettet til aminosyresekvensen (a-, b-, x-, og z-ioner), men dette krever da høyere energi enn dannelse av y- og b-ioner. Y- og b-ioner beskriver den samme aminosyresekvensen bare i motsatt retning, (Figur 9 viser en skjematisk oversikt over nomenklatur for fragmentering av peptidioner). Denne beskrivelsen er veldig spesifikk for et enkelt molekylion og er derfor veldig egnet for peptididentifikasjon [14, 27, 28].



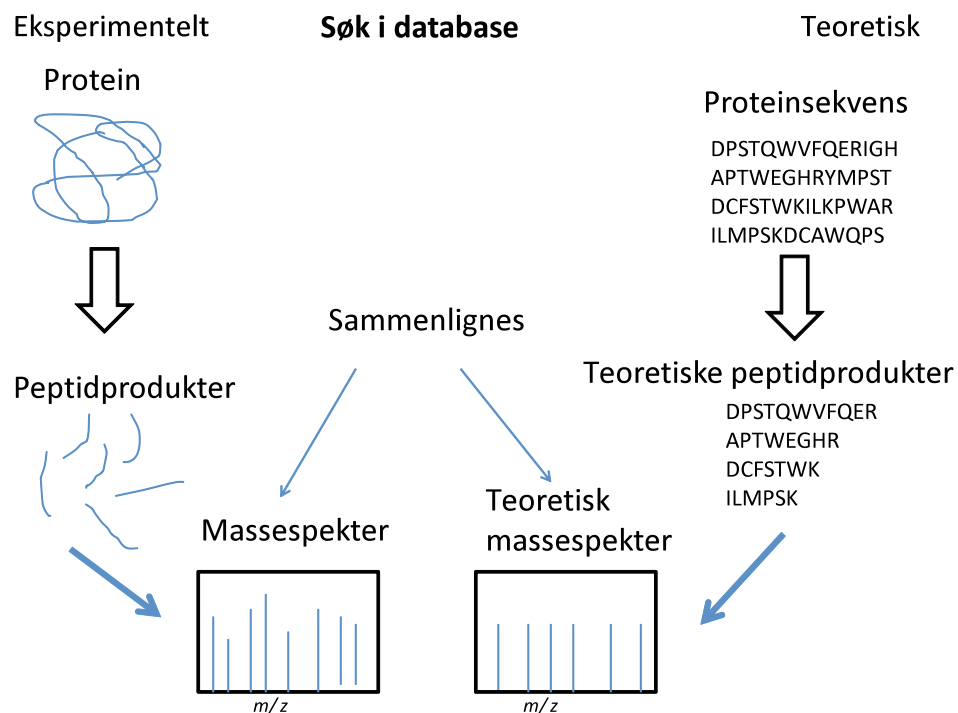
Figur 9: Fremstilling av nomenklatur for fragmentering av peptidioner [22].

4.8 Identifisering av peptidioner ved hjelp av databasesøk

Identifiseringen av proteiner gjøres som oftest ved å sammenligne eksperimentelle MS-data og/eller MS/MS-data med en database.

4.8.1 MS

Prinsippet bak peptidmassefingeravtrykk går ut på at proteinprøve blir spaltet til peptidprodukter med spesifikk protease som for eksempel trypsin som deretter analyseres på LC-MS. Databasen som anvendes må ha proteinsekvenser som spaltes med samme protease som brukes eksperimentelt for å kunne sammenligne peptidmassene mot hverandre. Målt m/z -verdi konverteres til peptidmasse, (se Figur 10). Kvaliteten på identifikasjonen er avhengig av MS-data, nøyaktigheten til databasen når det gjelder søk i algoritmen og programvaren som brukes. Når det søkes i database er det mulig å innsnevre antall treff ved å bruke parametere som proteasen som brukes, spesifisere antall "miss cleavage" og modifikasjoner til peptider. De teoretiske proteinsekvenser som ligner mest og har høyest treff på eksperimentelt MS-data blir valgt ut. Med fem eller flere peptidmasser som passer med det teoretiske MS-data øker andel av sekvensen som dekkes, og dermed sikres identiteten på proteinet [14, 28-30].

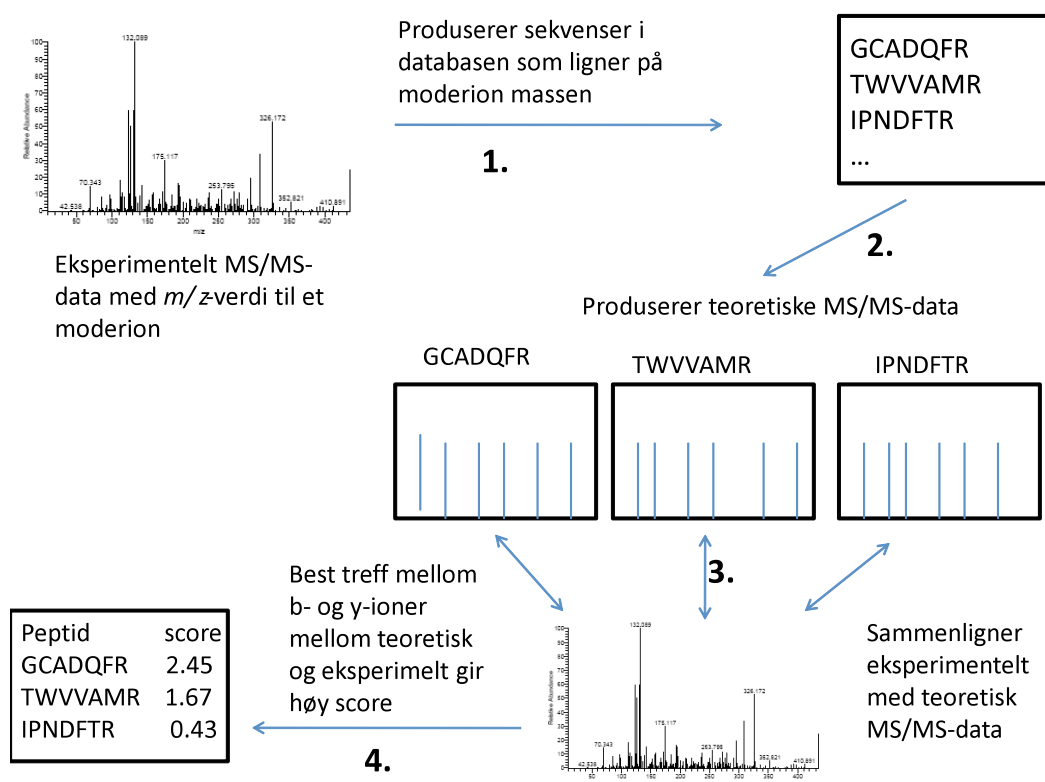


Figur 10: Proteinidentifisering ved hjelp av peptidmassefingeravtrykk. Fra venstre blir protein spaltet med protease og danner peptidprodukter. Massen blir målt med massespektrometri. Til høyre blir proteinsekvens i databasen utført et teoretisk klipp med samme protease som brukes eksperimentelt. Massen blir kalkulert og det konstrueres et MS-data som det eksperimentelle MS-data kan sammenlignes med.

4.8.2 MS/MS

Når prøven er kompleks, vil systemet foreslå flere proteiner som passer med peptidmassefingeravtrykk. Det gir derfor mer nøyaktig identifikasjon av peptider ved å bruke peptidfragmenter (MS/MS-data) enn med MS-data. Det finnes ulike databasesøk med innebygd algoritme som eksperimentelle MS/MS-data kan sammenlignes med. Alle databasesøk bruker forskjellige kriterier og produserer forskjellige scoringssystemer. SEQUEST er det første programmet som ble brukt for identifisering av peptider. SEQUEST som ble brukt i denne oppgaven er beskrevet under.

Før sammenligning av eksperimentelle MS/MS-data med database, oppgis det parametere som type protease og modifikasjoner som ble brukt for å innsnevre søket. I eksperimentelt MS/MS-data blir m/z -verdi til moderionet også oppgitt. Denne m/z -verdien brukes til å velge peptider med samme masse fra databasen som undergår klipp til teoretiske peptidsekvenser. Det produseres teoretiske MS/MS-data fra valgte peptidsekvenser. Eksperimentelle MS/MS-data blir analysert ved å sammenligne med teoretisk MS/MS-data, (se Figur 11). Et korrelasjonsscore blir kalkulert for hvert treff mellom disse dataene. Dette er basert på summen av topper til teoretisk og eksperimentelt MS/MS-data som overlapper hverandre, høy overlap gir høy korrelasjonsscore. SEQUEST rangerer score med grønne, gule og røde treff, grønne har høyere score enn gule og røde treff [14, 30, 31].



Figur 11: Illustrerer fremgangsmåten når eksperimentelt MS/MS-data brukes til peptidentifikasjon ved hjelp av programmet SEQUEST [14].

4.9 Multidimensjonal separasjon

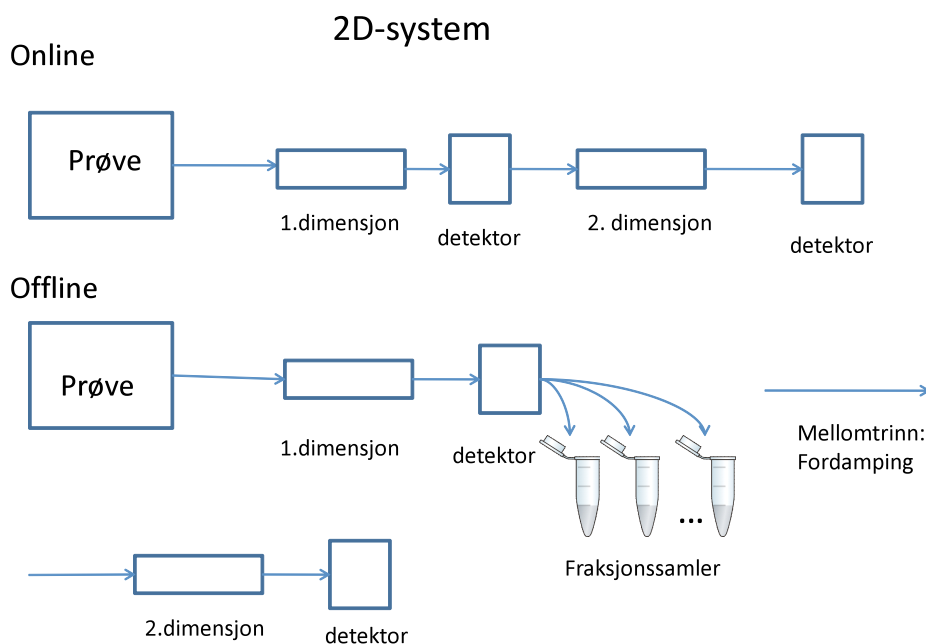
Linsekapsel er en kompleks blanding bestående av mange forskjellige komponenter, og det ble antatt at en dimensjon separasjon ikke ville gi god nok separasjon av slik blanding. For å få en bedre separasjon kan det kombineres ulike separasjonsmetoder i et 2D system.

4.9.1 2D-kromatografi

I et 2D system kobles to forskjellige separasjonsteknikker sammen for å redusere prøvekompleksiteten og for bedre separasjonen ytterligere. Det bør brukes to ortogonale separasjonsteknikker, det vil si at dimensjonene er basert på forskjellige separasjonsmekanismer. Separasjonsmekanismene kan for eksempel basere seg på molekylmasse, pI, molekylstørrelse og hydrofobisitet. Et 2D system med perfekt ortogonalitet er vanskelig å utføre fordi, større ulikheter mellom dimensjonene gir større problemer når dimensjonene skal kobles sammen [32]. Når det skal kombineres to ulike separasjonsmetoder er det flere faktorer man må ta hensyn til som for eksempel når mobilfase og stasjonærfase i første og andre dimensjon ikke er forenlig med hverandre. 2D-kromatografi kan derfor utføres online eller offline, (Figur 12 viser et skjematisk oppsett av online og offline systemer). Offline metode brukes gjerne når mobilfasene ikke er forenlig med hverandre. Når prøven elueres fra første dimensjon kan det samles i fraksjoner (for eksempel hvert minutt). Før fraksjonene injiseres til andre dimensjon, kan det gjøres mellomtrinn eksempelvis fordampning og tilsetning av kjemisk modifikatorer. Ulempen med offline er at det kan føre til kontaminasjon, lav reproducerbarhet, tap og fortynning av prøve. Online metode er raskere og mer reproducerbar enn offline, den foregår i et lukket system, det meste er automatisert og man unngår fraksjonslagring, men det kreves tilleggsutstyr som switchingmekanismer og flere pumper. Med online metode blir hele prøven overført til neste dimensjon slik at sensitiviteten er bedre sammenlignet med offline metode. På grunn av at hele prøven blir overført til neste dimensjon kan overloading

forekomme på kolonnen til andre dimensjon, men det kan unngås ved mellomlagring [33, 34].

Det ble valgt å kjøre prøvene i et offline 2D system i denne oppgaven.

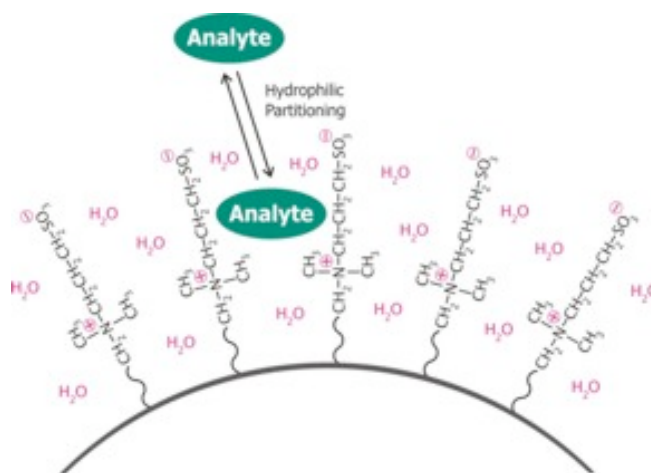


Figur 12: Viser et enkelt skjematisk oppsett for online og offline system. Forskjellen er at i et online system foregår alt automatisk, mens i offline system er det fraksjonssamler etter 1. dimensjon. Det kan også gjennomføres mellomtrinn før det injiseres til 2. dimensjon.

4.9.2 1.dimensjon - Hydrofil interaksjon væskechromatografi (HILIC)

For å få en bedre separasjon av komplekse blandinger som inneholder hydrofile komponenter (proteiner, peptider, aminosyrer, karbohydrater) kan det anvendes HILIC. Separasjonen baserer seg på hydrofile interaksjoner som hydrogenbindinger mellom analytt og stasjonærfasen. Stasjonærfasen er hydrofil, mens mobilfasen inneholder upolare organiske løsningsmidler. Hydrofile stoffer får lengre retensjon, og retensjonen avtar når stasjonærfasen blir mer hydrofob. HILIC kan sammenlignes

med normalfasekromatografi, men den vesentlige forskjellen er at HILIC elueres med en vanngradient. Det er indikasjon på at stasjonærfasen tar til seg vann fra mobilfase slik at det dannes et vandig lag, noe som tillater hydrofile analytter å fordele seg mellom det hydrofile laget og den upolare elueringsbuffferen, (se Figur 13). Ved å øke vannmengden, økes hydrofilisiteten til mobilfasen og man får eluering. Det finnes forskjellige stasjonærfaser i bruk som siloksaner, silanoler med og uten metaller [35-37]. I denne oppgaven ble ZIC-HILIC-kolonne benyttet. Denne stasjonærfasen er kovalent bundet til en zwitterionisk funksjonell gruppe av sulfobetain type som både har en positiv og negativ ladning på overflaten.



Figur 13: ZIC-HILIC [37].

4.9.3 Mobilfase

Siden vann i mobilfasen danner et vandig lag på stasjonærfasen er det viktig å opprettholde mengden av vann i mobilfasen, minimum tre prosent. Normalt består mobilfasen av 40-97 % acetonitril i vann eller i flyktig buffer. Økt mengde av organisk løsemiddel gir økt retensjon av analytten. Salter som brukes til bufferen bør være lett løselig pga høyt innhold av organisk løsningsmiddel [37]. Tilsetning av salter i mobilfasen øker polariteten i mobilfasen og reduserer retensjonen til analytten. Ammoniumacetat (NH_4Ac) ble brukt i denne oppgaven, fordi den i tillegg

til å være lettløselig sammen med organisk løsningsmiddel også er kompatibel med MS. pH i mobilfasen påvirker retensjonen når den ligger over eller under pK_a - verdien til analytten fordi det avgjør om analytten er ionisert form eller ikke. Hvis analytten har en lav pK_a - verdi og mobilfasen har høy pH, blir analytten fullstendig ionisert og hydrofilisiteten og retensjonen til analytten øker [35, 37, 38].

4.9.4 2.dimensjon-RPC

I den andre dimensjon ble omvendt-fase-kolonne benyttet. Dette omtales i kapittel 4.7.1.

5. Materialer og metoder

5.1 Kjemikalier, analytter og diverse utstyr

Tabell 1 til Tabell 5 viser kjemikalier, analytter og utstyr brukt i laboratoriearbeidet.

Tabell 1: Liste over kjemikalier.

Kjemikalie	Kvalitet	Leverandør
Acetonitril	$\geq 99,90 \%$	MERCK, Darmstadt, Tyskland
Ammoniumbikarbonat	$\geq 99,5 \%$	Fluka, Tyskland
Ammoniakk-løsning	25 %	MERCK, Darmstadt, Tyskland
DTT	$\geq 99,0 \%$	Fluka, India
Eddiksyre	100 %	PROLABO, Paris, Frankrike
IAA	$\sim 99 \%$	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO USA
Ionebyttet vann	HPLC-kvalitet	MERCK, Darmstadt Tyskland
Maursyre	$> 98 \%$	MERCK, Darmstadt, Tyskland
Metanol	$\geq 99,8 \%$	VWR international, BDH prolabo, EC
Trifluoroeddiksyre	$\geq 98 \%$	SIGMA, St. Louis, MO, USA

Tabell 2: Liste over proteiner.

Protein	Kvalitet	Leverandør
Linsekapsler fra ku	-	Fatland slakteri, Oslo
Linsekapsler fra pasienter med grå stær	-	Øyeavdeling (Ullevål sykehus)
Cytokrom c	Renstoff	SIGMA, St. Louis, MO, USA
Trypsin fra bovin pankreas	Essensielt saltfri (frysetørket)	SIGMA, St. Louis, MO, USA

Tabell 3: Liste over utstyr til ZIC-HILIC-UV.

Utstyr	Modell	Produsent
Autosampler	Ultimate WPS-300TSL	Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA
Kolonne	ZIC-HILIC, Dim (mm) 150x2.1, partikkelstr (µm) 5	SeQuant, Umeå, Sverige
Pumper	Ultimate HPG-3200M	Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA
Programvare	Chromeleon Version 6.8	Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA
UV-detektor	Ultimate VWP-3400	Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA

Tabell 4: Liste over utstyr til LC-MS/MS.

Utstyr	Modell	Leverandør
Autosampler/injektor	Ultimate 3000	Dionex, Sunnyvale, USA
Flow manager	Ultimate 3000	Dionex, Sunnyvale, USA
Ionefelle	LTQXL	Thermo scientific, San Jose, CA, USA
Kolonne	BioBasic-C8, Dim (mm) 50x1, partikkelstr (µm) 5	Thermo scientific, San Jose, CA, USA
Orbitrap	LTQ Orbitrap Discovery	Thermo scientific, San Jose, CA, USA
Programvare	Xcalibur version 6.8	Thermo scientific, San Jose, CA, USA
Pumpe	Ultimate 3000	Dionex, Sunnyvale, USA

Tabell 5: Liste over øvrig utstyr.

Utstyr	Modell	Produsent
Automatpipetter	Finnpipette	Labsystems, Helsinki, Finland/Thermo
Eppendorf LoBind	Protein LoBind Tube 1,5 mL	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland
Eppendorfrør	Brand microtubes 1,5 mL	Brand Tyskland
Glass Pasteur pipettes	150 mm	VWR
Inserts	Micro-insert 0,1 mL clear glass	WVR
Kork til vialer	C4010-1A target blue screw caps	Nationalscientific, Rockwood, USA
Magnetrører	-	Alphalab, variomag, Tyskland
Octadecyl (C18) 47 mm	Empore extraction disks	Teknolab
OMIX	OMIX C18, 100 µL	Varian, CA, USA
pH-meter	826 pH mobile, 827 pH lab	Methrohm, Sveits
Pinsett	Sterilt ved uåpnet pakning, PharmaPlast	England
Pipettespisser	Finntip	Labsystems, Helsinki, Finland
Ristemaskin	Vibramax 100	Heidolph, Tyskland
Sentrifuge (liten)	Galaxy mini centrifuge	VWR, Korea
Sentrifuge (stor)	Centrifuge 5804	Hamburg, Tyskland
Septa	C4010-10 10 mm septer	Nationalscientific, Rockwood, USA
Skalpell	Sterilt ved uåpnet pakning, Paragon®	Sheffield, England

Speedvac	SPD11P-230	Thermo electron corporation, Milford USA
Thermomixer comfort	-	Fischer scientific, Norge
Ultralyd/ultrasonic cleaner	-	VWR, Malaysia
Varmeskap	Termaks	Termaks, Bergen, Norge
Vannrenseanlegg	EASYpure UV	Barnstead storage system, USA
Vekt	XS205 dualrange	Mettler toledo AS, Norge
Vialer	-	Nationalscientific, Rockwood, USA
Vortexmikser	IkA MS 3 digital	Fischer scientific, Norge

5.2 Tillaging av buffere

5.2.1 Tillaging av 20 mM maursyre

Tilsatte 377 μ L konsentrert maursyre i 500 mL målekolbe som fylles opp med ionebyttet vann til målestreken.

5.2.2 Tillaging av ammoniumbikarbonat 50 mM, pH ca 8

Det ble veid inn ca 80,0 mg ammoniumbikarbonat i en 20 mL målekolbe, ionebyttet vann ble fylt opp til målestreken. På grunn av dårlig stabilitet, ble det laget ferskt for hvert forsøk.

5.2.3 Tillaging ammoniumacetat 20 mM, pH ca 5.5

Tilsatte 1,144 mL konsentrert eddiksyre til ca 1 L ionebyttet vann, deretter ble pH justert med ammoniakkløsning 25 % ved hjelp av magnetrører og pH-meter. Videre ble blandingen overført til 1 L målekolbe og ionebyttet vann ble fylt opp til målestreken [39].

5.2.4 Tillaging av 0,1 % TFA-løsning

Det ble laget 10 % (v/v) TFA som stamløsning. En ampulle (1 mL) 100 % TFA ble blandet med 9 mL ionebyttet vann. Deretter ble løsningen fortynnet til ønsket konsentrasjon på 0,1 % TFA ved å ta 100 µL fra stamløsningen blandet med 9900 µL ionebyttet vann.

5.3 Tillaging av mobilfaser

5.3.1 Mobilfaser til LC-MS

Mobilfase A:

Metanol og 20 mM maursyre i forhold 5:95 (v/v).

Mobilfase B:

Metanol og 20 mM maursyre i forhold 95:5 (v/v).

5.3.2 Mobilfaser til HILIC

Mobilfase A:

20 mM NH₄Ac og ACN i forhold 1:4 (v/v).

Mobilfase B:

20 mM NH₄Ac og ACN i forhold 3:2 (v/v).

5.4 Tillaging av reagenser

Reagensene ble laget rett før tilsetning på grunn av dårlig stabilitet. Innveid tørrstoff ble lagret i kjøleskap (DTT) og fryser (IAA) før tilsetning.

5.4.1 Tillaging av DL-Dithiothreitol 6,5 mM

Det ble veid ut 1,0 mg DL-Dithiothreitol tørrstoff som ble løst i 1 mL ionebyttet vann.

5.4.2 Tillaging av Iodoacetic acid 54 mM

Det ble veid ut 10,0 mg iodoacetat tørrstoff som ble løst i 1 mL ionebyttet vann.

5.5 Tillaging av peptidløsninger

5.5.1 Tillaging av trypsinløsning 1 mg/mL

Det ble veid ut 1,0 mg trypsin tørrstoff som ble løst i 1 mL ABC-buffer.

Trypsinløsningen ble laget rett før bruk for å sikre maksimal aktivitet av trypsin. Det ble laget fortynningsrekke i ønsket konsentrasjon ved å fortynne stamløsningen i ABC-buffer.

5.5.2 Tillaging av cytochrom c løsning 2 mg/mL

Det ble laget en stamløsning på 2 mg/mL ved å veie ut 10,0 mg cytochrom c tørrstoff som ble løst i 5 mL ionebyttet vann. Det ble laget fortynningsrekke i ønsket konsentrasjon ved å fortynne stamløsningen i ABC-buffer. Stamløsningen ble oppbevart i fryser ved -32 °C og ble kun tint ved bruk.

5.6 Løsninger til SPE

5.6.1 Selvlagede C18 SPE-tipper

Kondisjoneringsløsning: ACN og ionebyttet vann i forhold 1:1 (v/v).

Vask: 20 mM maursyre.

Elueringsløsning: ACN og 20 mM maursyre i forhold 4:1 (v/v).

5.6.2 Kommersielt SPE: OMIX

Prøven: Surgjøres med 0,1 % TFA.

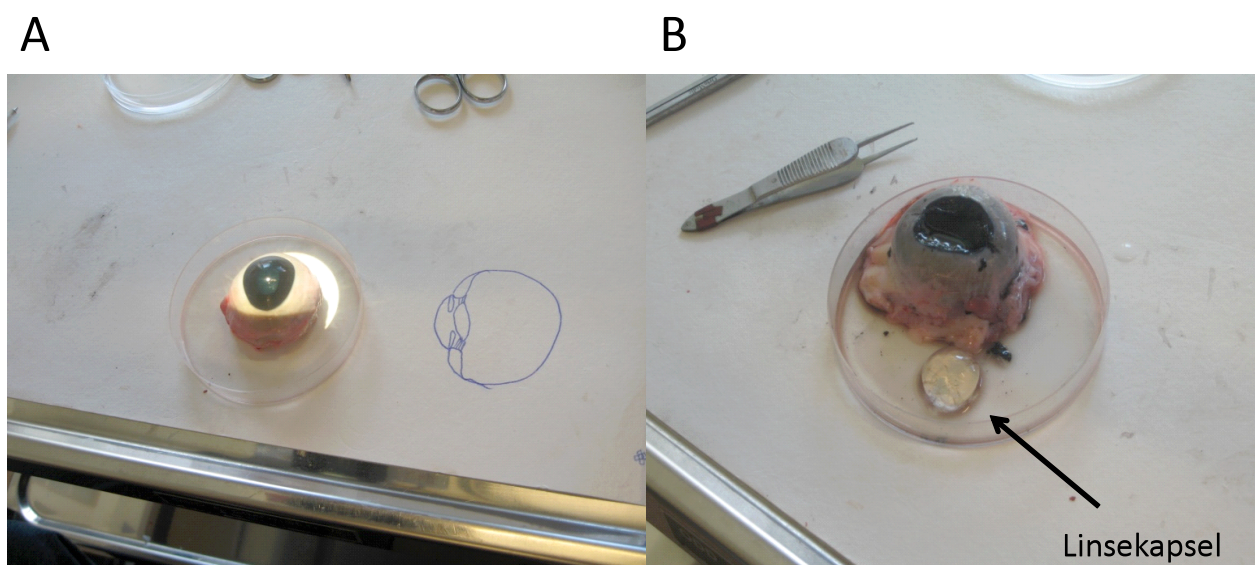
Kondisjoneringsløsning: ACN og ionebyttet vann i forhold 1:1 (v/v).

Elueringsløsning: ACN og 20 mM maursyre i forhold 3:1 (v/v).

5.7 Linsekapsler fra ku og pasienter

5.7.1 Linsekapsel fra ku

Kuøyne ble hentet på Fatland slakteri i Groruddalen i Oslo. Øynene ble hentet noen timer etter at kuene ble slaktet. Linsene ble dissekert ut umiddelbart og kapselen frigjort for nedfrysing. I motsetning til pasientprøvene ble hele linsekapselen fjernet. Størrelsen av linsen var omtrent 17-18 mm i diameter. (Figur 14 illustrerer hvordan linsekapsel tas ut av kuøyet.)



Figur 14: A og B illustrerer et kuøye. B illustrerer linsen som ble dissekert ut av øyet. Kapselen omgir linsen som en tynn hinne ble forsiktig fjernet fra linsen med en pinsett.

5.7.2 Linsekapsel fra pasienter med grå stær

Eksfoliasjonsmaterialet i øyet gir økt sjanse for utvikling av grønn stær. Det har imidlertid vist seg at også noen pasienter med bare grå stær har forekomst av eksfoliasjonsmaterialet i øyet [32]. Linsekapsler som ble brukt i denne oppgaven var fra pasienter med bare grå stær. Ved grå stær blir linsen ugjennomsiktig og synet blir tåkete og uklart. Ved operasjon for grå fjernes et lite stykke kapsel på den fremre

delen av linsen. Dette gjøres før man suger opp linsemassen med en tynn nål. Ved intraokulær linseimplantasjon settes det inn en kunstig linse i den delen av linsekapselen som ikke er fjernet [40]. Noen pasienter med grønn stær kan i tillegg utvikle grå stær. I slike tilfeller kan grå stær opereres med nevnte metode. Operasjon for grønn stær utføres på en annen måte, men da er linsekapselen fortsatt intakt. Prøvematerialet til denne oppgaven var hentet fra pasienter med grå stær, det vil si fremre delen av linsekapselen ble fjernet i forbindelse med operasjonen. Siden eksfoliasjonsmaterialet kan forekomme både hos pasienter med grønn og grå stær kan resultater fra pasienter med grå stær overføres til pasienter med grønn stær, noe som gjøres i denne oppgaven. Linsekapslene kommer fra to ulike pasientgrupper med grå stær. En med eksfoliasjon på linsen og en uten. Det ble brukt to pasienter i hver gruppe i denne oppgaven.

5.8 Digest med trypsin

Det ble utført en metode som kalles in-gel metode i oppgaven. Dette innebærer vask av linsekapselen med ionebyttet vann og ACN og tilsetning av reagenser som DTT og IAA for reduisering og alkylering. For hver tilsetning ble prøven rørt i vortexmikser og væsken fjernet fra prøven før neste tilsetning. For in-gel metode 2 var prøvemengden mye mindre at det måtte benytte mikroskop for hver fjerning av væske for å sikre at linsekapselen fortsatt var i eppendorfrøret. Det ble tilsatt trypsin for spalting av proteiner til peptider. ABC-buffer ble tilsatt på slutten som sørget for at hele linsekapselen ble dekket for deretter inkubering over natten.

Tilsatt mengde av reagenser var beregnet fra gjennomsnittsmassen til fire linsekapsler, som ble tint i noen minutter før veiing. Videre ble gjennomsnittsmassen delt i to, da det ble brukt halv linsekapsel i in-gel metode 1. Linsekapselen inneholder ca 90 % proteiner hvorav 80 % kollagen og ca 10 % andre proteiner. Mengden ble beregnet ut i fra forholdet:

DTT: 1 μg DTT: 50 μg protein
IAA: 1 μg IAA: 10 μg protein
Trypsin: 1 μg trypsin: 40 μg protein

Massene som ble veid kan ses i resultatdelen i kapitel 6.1. Størrelsen på pasientprøver var mye mindre enn linsekapsler fra ku, og årsaken er at ved grå stær operasjon beholder pasienter store deler av sine egne linsekapsler. Det ble antatt at linsekapslene fra pasienter veide under 1 mg, og tilsatt mengde på reagensene ble regnet ut i fra dette. Disse mengdene ble også brukt for linsekapsler fra ku i in-gel metode 2.

5.8.1 Prosedyre for in-gel metode 1 og 2

In-gel metode 1 ble brukt når prøvematerialet var linsekapsler fra ku. Linsekapselen ble delt i to da linsekapsler fra ku var relativt store. In-gel metode 2 ble brukt både for pasienter og linsekapsler fra ku, men da var prøvematerialet fra ku skåret i mindre biter og hadde tilnærmet likt format som pasientprøvene. Linsekapslene fra ku og pasienter ble oppbevart i fryser ved -32 °C. Før prøveopparbeidelsen ble de tint i noen minutter ved romtemperatur. Linsekapselen ble først skylt godt med ionebyttet vann. Ved bruk av skalpell og pinsett ble linsekapselen delt i to for bruk i in-gel metode 1 og i mindre biter til in-gel metode 2. Delte linsekapsler ble lagt i LoBind eppendorfrør.

5.8.2 Prosedyre for in-solution metode 1 og 2

Risikoen for å miste pasientprøven i in-gel metode 2 var stor selv om det ble tatt i bruk mikroskop. Det ble derfor brukt in-solution metode 1 og 2 hvor det kun ble tilsatt reagenser uten å fjerne løsningene underveis for å redusere sjansen for at linsekapselen ble fjernet. In-solution metode 1 ble brukt når linsekapselen fra ku ble

delt i to. In-solution metode 2 ble både brukt for linsekapsler fra ku og pasienter.

Prosedyren for metodene er beskrevet i Tabell 6.

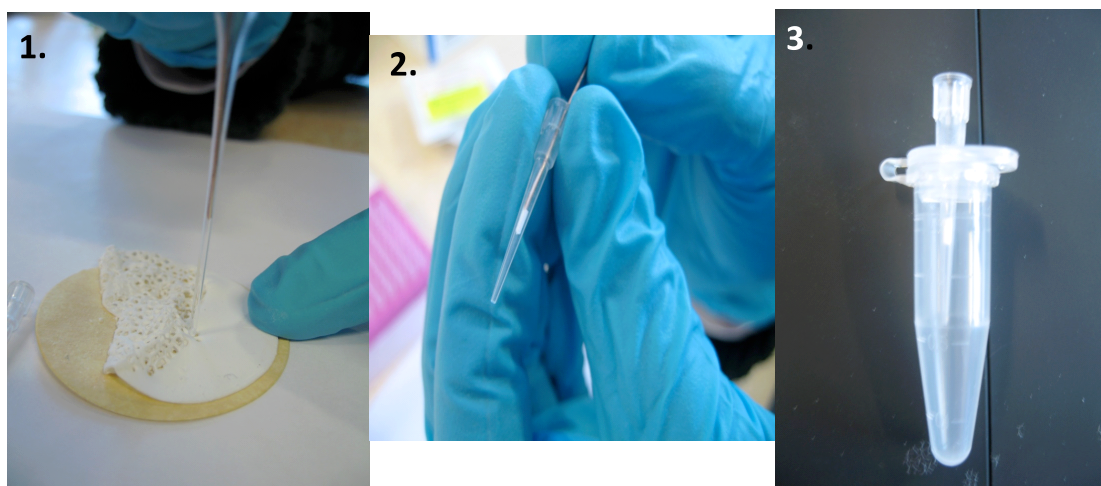
Tabell 6: viser prosedyren for in-gel metode 1, in-gel metode 2 og in-solution metode 1 og in-solution metode 2.

Prosedyre	In-gel metode 1	In-gel metode 2	In-solution metode 1	In-solution metode 2
1. Skyll linsekapselen godt med ionebyttet vann				
2. Vask med ionebyttet vann	100 µL	50 µL		
3. Tilsett ACN	120 µL	60 µL		
4. Tilsett DTT, varmes opp til 95 °C i 15 minutter. Videre må det avkjøles før neste tilsetning	58 µL	20 µL	58 µL	20 µL
5. Tilsett ACN	60 µL	30 µL		
6. Alkyler med IAA, inkuberes i 30 minutter i romtemperatur i mørket	29 µL	10 µL	29 µL	10 µL
7. Tilsett ACN	60 µL	30 µL		
8. Tilsett ABC-buffer	60 µL	30 µL		
9. Tilsett ACN	60 µL	30 µL		
10. Tilsett ABC-buffer	60 µL	30 µL		
11. Tilsett ACN	100 µL	50 µL		
12. Tilsett trypsin, inkuberes på is i 30 minutter	72 µL 10 µg/mL	25 µL 1 mg/mL	72 µL 10 µg/mL	25 µL 1 mg/mL
13. Tilsett ABC-buffer for å dekke linsekapselen, spaltes over natten ved 37 °C i varmeskap	10-20 µL	10-20 µL	10-20 µL	10-20 µL

5.9 SPE

5.9.1 Tillaging av SPE-tip

SPE-tipper ble laget ved å fylle tippene med C18-materiale. Dette ble gjort ved å trykke ut seks puter fra en 3M EMPORE C18 disk ved hjelp av en pasteurpipette. Videre ble det overført til en 10 μ L pipettespiss ved å trykke den ut med en metalltråd. Putene ble pakket tett sammen ved å dytte de forsiktig sammen ved hjelp av en metalltråd, (se Figur 15).



Figur 15: 1 og 2 illustrerer tillaging av SPE-tip, 3 er SPE-tip plassert i eppendorfrør som har et hull på lokket.

5.9.2 Prosedyre for SPE

Etter in-gel metode 1 og 2 og in-solution metode 1 og 2 ble det utført en fast-fase-ekstraksjon, dette var nødvendig for å unngå at selve linsekapselen skulle injiseres direkte i LC-MS/MS. Før prøvepåsetting ble det tilsatt ABC-buffer for å gjøre prøven mindre viskøst slik at det ble lettere å få prøven igjennom SPE-tippene. Valg av SPE materialet ble begrunnet i kapittel 6.1.2. Det ble laget et hull på lokket til eppendorfrøret for å gjøre plass til pipettespissen med SPE-materialet.

Prosedyren for bruk av SPE-tippene var som følger:

1. Kondisjonere med 50 μL * 2 med kondisjoneringsløsning
2. Vask med 50 μL * 2 20 mM maursyre
3. Påsetting av 25 μL * 4 prøve
4. Vask med 25 μL * 4 20 mM maursyre
5. Overfør SPE-tippen over til et nytt LoBind eppendorfrør
6. Eluering med 25 μL * 2 med elueringsløsning

For hver tilsetting av løsning, ble løsningen dratt gjennom SPE-tippene ved hjelp av sentrifuge. Rotasjonen per minutt (rpm) var 3000 i to minutter, men ved prøvepåsetting ble rpm økt til 8000 i 10 minutter da prøveløsningen var veldig viskøst og vanskelig å få igjennom SPE-materialet.

OMIX

C18-OMIX-tipper beregnet for 100 μL er ferdigproduserte SPE-tipper bestående av omvendt-fase-monolittsilikasorbent. Det er kun molekyler som har hydrofobe egenskaper som vil interagerer med sorbenten. Salter, detergenter og hydrofilemolekyler som ikke interagerer med sorbenten vil skylles vekk. Prøven ble først tilsatt 0,1 % TFA slik at pH ble omtrent 4, dette for å få basiske gruppene på peptidene på protonert form. Det ble dannet ionepar med TFA, slik at hydrofobisiteten og retensjonen økte. En finnpipette ble brukt for å suge og fjerne væske fra OMIX-tippen [41].

Prosedyren for bruk av OMIX var som følger:

1. Fukte OMIX-tippen ved å suge opp 100 μL * 2 vaskeløsning, dette for øke interaksjonen mellom sorbenten og peptider og for å få en bedre retensjon.
2. 100 μL * 2 0,1 % TFA for å fjerne rester fra punkt 1.
3. Prøven suges opp og ned med finnpipette mellom fem til ti ganger.

4. Vask med 100 μL * 2 0,1 % TFA for å fjerne interferenser som er svakt bundet til OMIX-tippen.
5. Eluering med 100 μL med elueringsmiddel til et nytt eppendorfrør.

Etter eluering ble løsemidlet dampet av med Speedvac som baserer seg på vakuum, varme og sentrifugekrefter. Deretter ble prøven reløst med mobilfase A (enten fra 1. dimensjon eller 2. dimensjon) som tilslutt ble injisert direkte på HILIC/LC-MS/MS.

5.9.3 Fortynning av prøve før fast-fase-ekstraksjon

Prøven ble tilsatt en viss mengde ABC-buffer før prøvepåsetting på grunn av at viskositeten til linsekapselen gjorde det vanskelig å utføre fast-fase-ekstraksjon. In-gel metode 1 ble utført som tidligere, men før digest med trypsin ble det tilsatt 20 μL 500 $\mu\text{g/mL}$ cytokrom c. Cytokrom c ble brukt som modellprotein da prosedyren for klipping av cytokrom c var enkel. Cytokrom c har 104 aminosyrer og 21 spaltingssteder for trypsin. Aminosyresekvensen vises i Figur 16. Den inneholder ikke disulfidbindinger, alkylering og redusering var derfor ikke nødvendig. Prøven ble fortynnet med 15 μL , 20 μL , 25 μL opptil 50 μL ABC-buffer for å sjekke den optimale fortynningsmengden som gjorde det enklere å utføre SPE samt at intensiteten på cytokrom c ble opprettholdt.

MGDVEK <u>G</u> KKIFVQKCAQCHTVEKGGKHKTGPNLHGLFGRKTGQAPGFTYTDAN KNKGITWKEETLMEYLENPKKYIPGTQMIFAGIKKKTEREDLIAYLKKATNE
--

Figur 16: Illustrerer aminosyresekvensen til cytokrom c, understrekning under K og R er spaltingssteder for trypsin.

5.10 1. dimensjon-HILIC

Det ble valgt å ta i bruk todimensjonal væskerkromatografi for å sjekke om separasjonen ble bedre. Etter in-gel metode 1, SPE og inndamping, ble prøven reløst i mobilfase A (20 % 20 mM NH₄Ac, 80 % ACN (v/v)).

Kolonne: ZIC-HILIC

Injeksjonsvolum: 30 µL

Tabell 7: Gradientprogram i HILIC.

Tid (min)	Flow (µL/min)	Mobilfase A (%)	Mobilfase B (%)
0	200	100	0
12.5	200	82.5	17.5
30	200	35	65
31	200	35	65
32	200	100	0
50	200	100	0

Det ble gjort en manuell fraksjonering i 1. dimensjon. Fraksjonene var i ett minutt fra 0-30 minutter. Fra utgangen til UV-detektoren ble det koblet til en lang tubing som overførte prøven til LoBind eppendorfrør hvor oppsamlingen foregikk. Det ble valgt å bruke bølgelengde 214 nm og 254 nm på UV-detektoren, hvor peptider har god absorpsjon [39].

5.10.1 Inndamping

Fra første dimensjon inneholder fraksjonene mye ACN som vil gi en kraftig elueringsstyrke på RPC kolonnen. Fraksjonene fra første dimensjon ble derfor

dampet av ved hjelp av Speedvac og deretter reløst i mobilfase A fra andre dimensjon [39].

5.11 2. dimensjon-RPC

Injeksjonsvolum: 20 µL

Kolonne: BioBasic C8

Tabell 8: Gradientprogram i RPC.

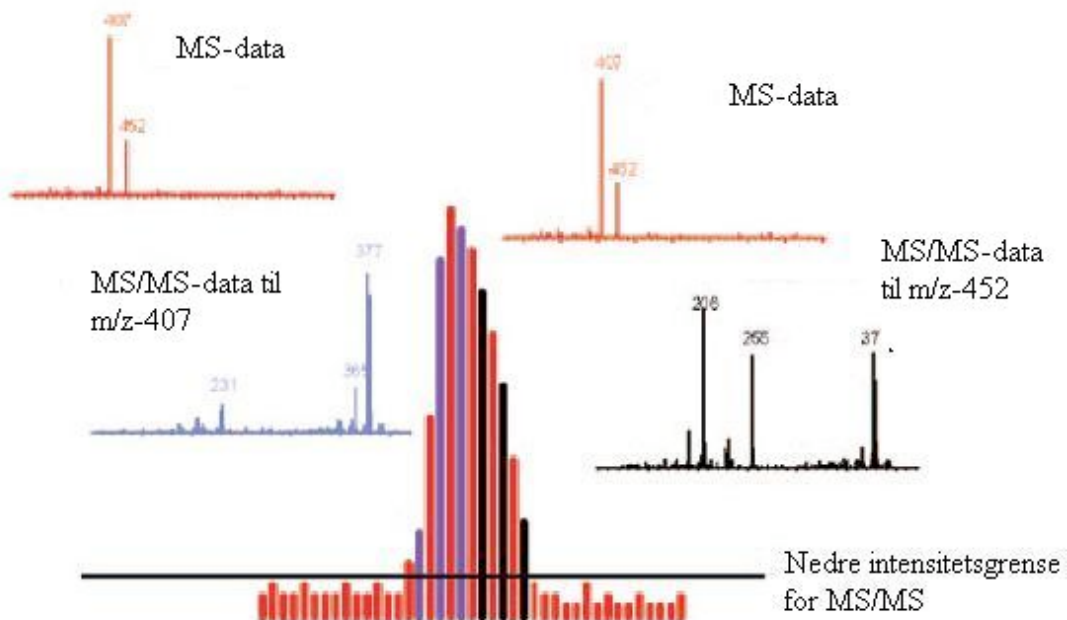
Tid (min)	Flow (µL/min)	Mobilfase A (%)	Mobilfase B (%)
0	50	100	0
55	50	0	100
59	50	0	100
64,5	50	100	0
65	100	100	0
69	100	100	0
70	100	100	0

Betingelser for MS:

ESI-mode	Positiv
Tørkegass	Nitrogen
Hastighet på tørkegass	10-20 L/min
Forstøvergass	Nitrogen
Kildespenning	5 kV
Kapillærtemperatur	275 °C

I en kompleks blanding kan det forekomme at peptidioner overlapper hverandre i MS-data. Under slike hendelser vil de mest intense peptidionene selekteres for videre

fragmentering i den lineære ionefellen. Ved scan event 1 (se Tabell 9 for betingelser) utføres det scan mellom 250-2000 m/z , i scan event 2 fragmenterer ioner som har høyest intensitet fra scan 1. Dette resulterer i færre MS/MS-data i forhold til MS-data. For å få flest mulige peptididentifikasjoner kan det benyttes dynamisk eksklusjon hvor prinsippet er at ioner blir satt på en liste etter fragmenteringen. Ionene blir ekskludert fra fragmenteringen i en tidsperiode, og dermed kan også andre ioner med lavere intensitet fragmentere. Ionene blir ekskludert fra listen etter å ha blitt tatt opp maksimalt to MS/MS-data [42, 43]. (Figur 17 illustrerer prinsippet ved dynamisk eksklusjon, se Tabell 10 for betingelser for scan event 2.)



Figur 17: Illustrerer at m/z 407 som har høyere intensitet enn m/z 452 fragmenteres først. Når m/z 407 blir satt på eksklusjonsliste fragmenteres også m/z 452. Det utføres ikke fragmentering under nedre intensitetsgrense [43].

Tabell 9: Scan event 1.

Scantid	3-64 minutter
Event scan (m/z)	250-2000
Oppløsning	30 0000

Tabell 10: Scan event 2.

1. Event scan (m/z)	250.00-2000.00
2. MS/MS “data dependent scan”	Mest intense ion fra 1. med dynamisk eksklusjon
Activation type	CID
Repeat count	2
Repeat duration	30 sek
Exclusion list size	200
Exclusion duration	30 sek
Minimum signal threshold	100 000
Normalized collision energy	35
Default charge state	2
Isolation with	2 m/z

5.12 Identifisering av proteiner

MS/MS-data ble søkt opp mot database i SEQUEST. Parameterne som ble brukt var:

Masseområde	350-5000 Da
Aktiveringstype	CID
Database	Bovine.fasta/ human.3,67. fasta
Proteolytisk enzym	Trypsin
Antall "miss cleavages"	2
Konstante modifikasjoner	Karboksymetyl – cystein
Variable modifikasjoner	Oksidasjon – metionin
Filter som fjerner røde treff	Peptid confidence
Fjerne falske positive søk	Decoy database search

6. Resultater og diskusjon

6.1 Innledende forsøk

Metodene som ble anvendt i oppgaven er beskrevet i kapitel 5.8, og mengde reagenser som ble brukt ble beregnet ut fra gjennomsnittsmassen av fire linsekapsler fra ku:

1. linsekapsel	59,84 mg
2. linsekapsel	56,01 mg
3. linsekapsel	56,94 mg
4. linsekapsel	58,19 mg
Gjennomsnittsmassen	57,75 mg

I den første delen av oppgaven ble det utført analyse av linsekapsel fra ku med tilsatt cytokrom c. Forsøk med cytokrom c ble analysert på LC-MS, det ble utført i SIM mode med m/z -verdier som er velkjente for spaltet cytokrom c. For de andre forsøkene ble det kjørt LC-MS/MS i SCAN mode. Det ble benyttet fullt sveip slik at MS tar opp ønsket m/z -verdi område. Fullt sveip er vanlig å benytte ved analysering av ukjent forbindelse. Hensikten med første del av oppgaven var å bli kjent med prøveopparbeidelsen for linsekapselen, og det ble testet ut om trypsin kunne spalte cytokrom c i nærvær med linsekapselen. Dette for å teste at trypsin ikke hemmes av substanser fra linsekapsel.

6.1.1 Cytokrom c klipp i nærvær med linsekapsel fra ku.

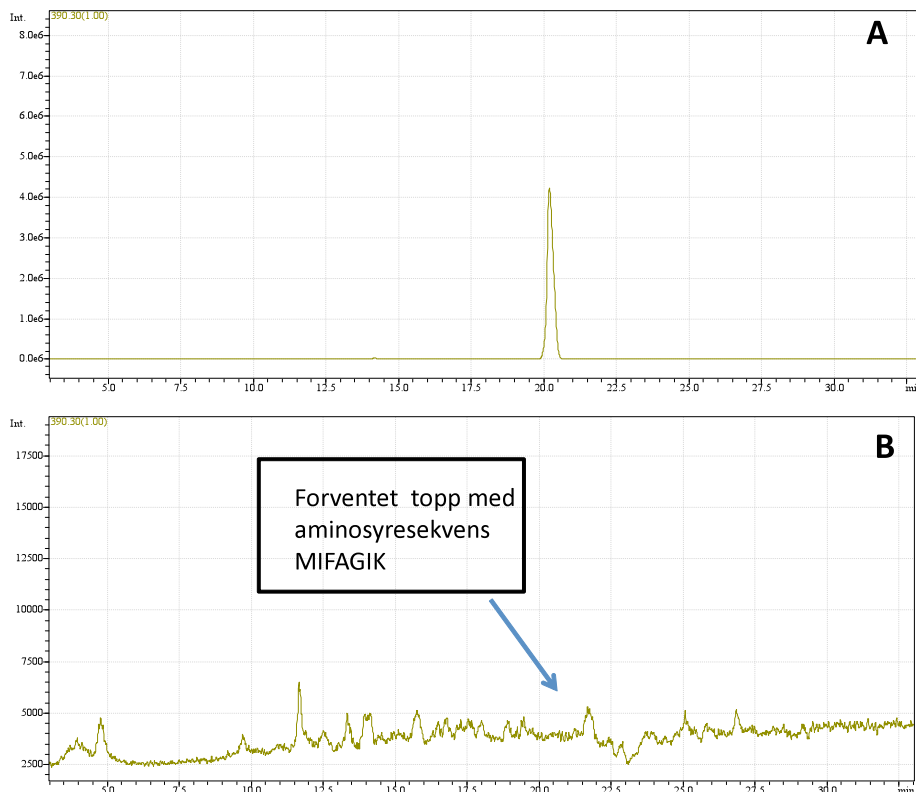
Fra stamløsningen til cytokrom c ble det laget en fortynningsrekke, sluttkonsentrasjonen var 1 $\mu\text{g/mL}$. Det ble utført in-gel metode 1 for to parallelle prøver hvorav den ene prøven ble tilsatt cytokrom c rett etter tilsetting av trypsin. Etter inkubering ble det gjort SPE og analysert på LC-MS. Figur 18 viser

kromatogram A for prøven med tilsatt cytokrom c. Deteksjonen var innstilt på SIM-mode med verdi $m/z = 390,3$ som tilhører aminosyresekvens MIFAGIK.

Kromatogrammet viser en fremtredende topp etter et tryptisk klipp av cytokrom c.

Kromatogram B er uten tilsatt cytokrom c, men med samme m/z -verdi som i A.

Resultatet for kromatogram B var ingen synlige topper og den hadde mye lavere intensitet enn A hvilket vil si at grunnlinjen var rett.



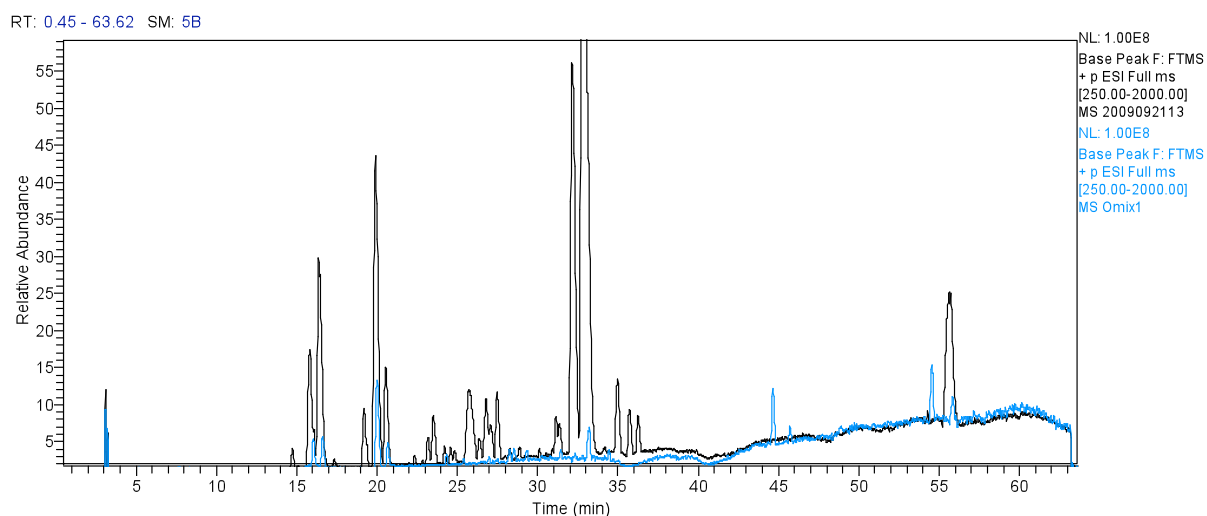
Figur 18: Kromatogram A med $m/z = 390,3$ med tilsatt cytokrom c, Kromatogram B med m/z -verdi = 390,3 uten tilsatt cytokrom c. (Kromatogrammene har forskjellig skala på y-aksen. Toppen i kromatogram A har en intensitet på ca $4 \cdot 10^6$.)

Dette viser at trypsin ikke hemmes av komponentene i linsekapselen fra ku og trypsin kan dermed brukes som protease til videre forsøk med linsekapsler.

6.1.2 Valg av SPE

Både selvlagede SPE-tipper og kommersiell tilgjengelige OMIX-tipper ble testet som SPE-materiale. Årsaken til testing av OMIX-tippene var at prøvematerialet ofte tettet de selvlagede SPE-tipper. OMIX-tipper består av monolittmateriale som gir mye mindre mottrykk enn selvlagede SPE-tipper. Dette kan føre til at det blir lettere å utføre SPE med linsekapslene.

Etter å ha utført in-gel metode 1 med linsekapsler fra ku, ble prøvematerialet opparbeidet ved hjelp av selvlagede SPE-tipper og OMIX-tipper. Før prøvepåssetting til SPE-tipper ble prøvematerialet fortynnet med 25 µL ABC-buffer, mens til OMIX-tipper ble prøven påsatt direkte uten fortynning med ABC-buffer. Videre ble prøvene analysert på LC-MS/MS. Figur 19 viser kromatogrammene av OMIX med blå farge og selvlagede SPE-tipper er med sort farge.

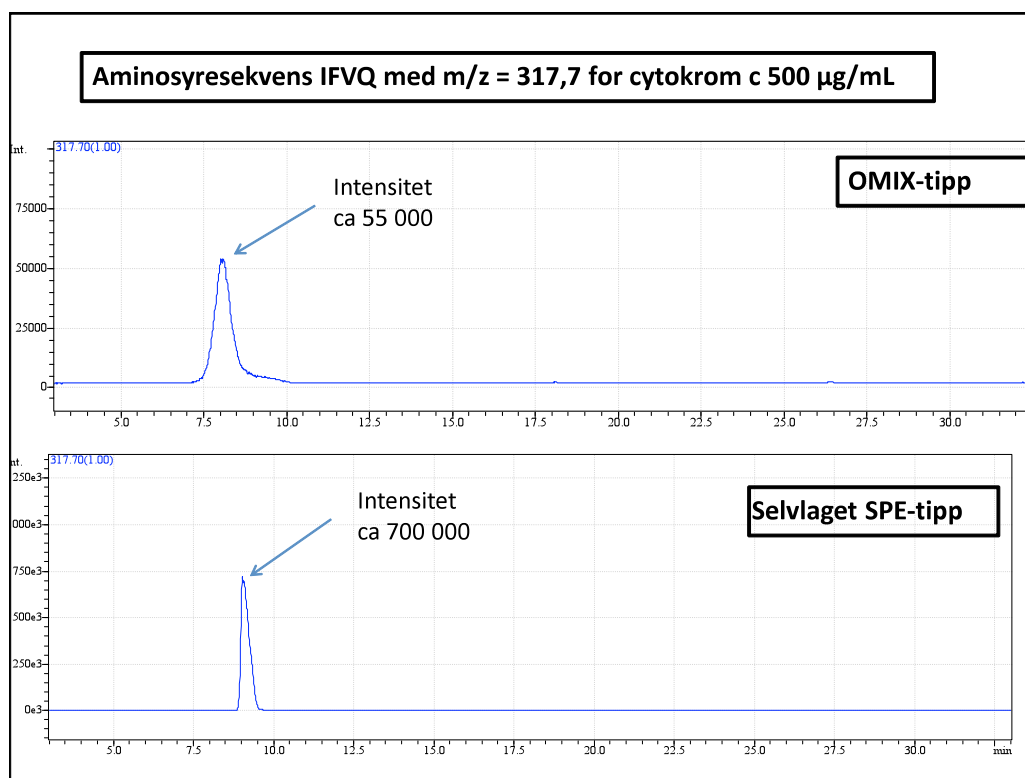


Figur 19: Kromatogram med blå farge er med OMIX og sort farge er med selvlagede SPE-tip.

Figur 19 viser at intensiteten og separasjonen til linsekapsler fra ku som var blitt utført med in-gel metode 1 var større og bedre med SPE-tipper enn med OMIX-

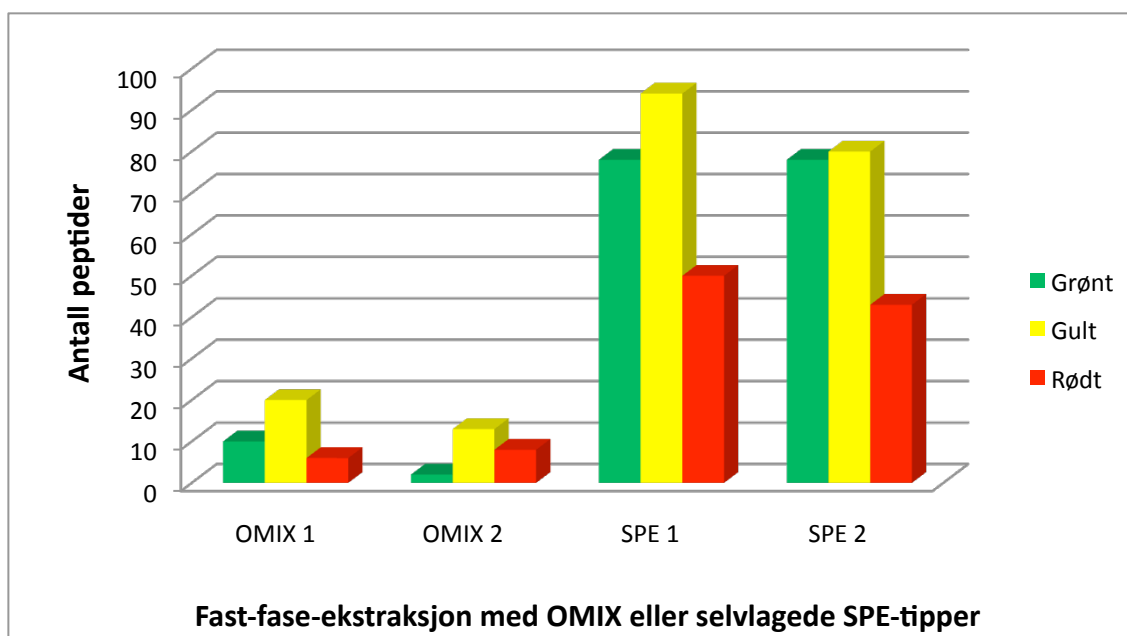
tipper. Teoretisk skulle intensiteten til prøven utført med OMIX-tipper være større da prøven til SPE-tipper ble fortynnet med 25 μ L ABC-buffer før prøvepåsetting.

For å sikre at det ikke var selve prøveopparbeidelsen som ga så store forskjeller, ble det derfor gjort forsøk med spaltet cytokrom c for å sjekke om det også var like store variasjoner her. Fra tidligere forsøk var det forventet å få topp ved $m/z = 317,7$. Cytokrom c ble påsatt på OMIX-tipper og SPE-tipper før injisering på LC-MS. Ved bruk av OMIX-tipper vises det i Figur 20 at toppen var bredere, den ga lang retensjonstid og intensiteten var mindre enn ved bruk av selvlagede SPE-tipper som ga kortere retensjonstid og smalere topp. Resultatet viser at det også var forskjeller for cytokrom c som med linsekapslene, og at prøveopparbeidelsen til linsekapselen ikke påvirket resultatene.



Figur 20: Illustrerer kromatogram for cytokrom c ved bruk av OMIX-tip og SPE-tip.

Når MS/MS-data til linsekapslene sammenlignes med teoretiske peptider i databasen til SEQUEST, blir teoretiske peptider målt mot eksperimentelle peptider [44]. SEQUEST har et scoringssystem, når teoretiske peptider har stor likhet med eksperimentelle peptider oppnås det høy score, grønt peptidtreff. Mens gult og rødt treff indikerer lavere likhet mellom disse peptidene. Massespektrene til peptidene ble sammenlignet med database fra SEQUEST. Antall peptidtreff var varierende for de ulike ekstraksjonene. Figur 21 viser antall peptidtreff etter SPE prosedyrene og LC-MS/MS. SPE 1 og SPE 2 i Figur 21 er parallelle prøver som ble utført med in-gel metode 1 og deretter brukt selvlagede SPE-tipper, det samme gjaldt for OMIX 1 og OMIX 2, men da ble det brukt OMIX-tipper i stedet for SPE-tipper. Det kommer tydelig frem i Figur 21 at prøveoppbehandling med selvlagede SPE-tipper får flere peptidtreff enn med OMIX-tipper. Resultatet viser også at antall peptidtreff var varierende for OMIX-tipper enn for selvlagede SPE-tipper. Bruk av OMIX-tipper kan medføre at peptidene ble vasket ut med vaskeløsningen og/eller det ble benyttet svak elueringsmiddel slik at hele prøven ikke ble eluert ut.



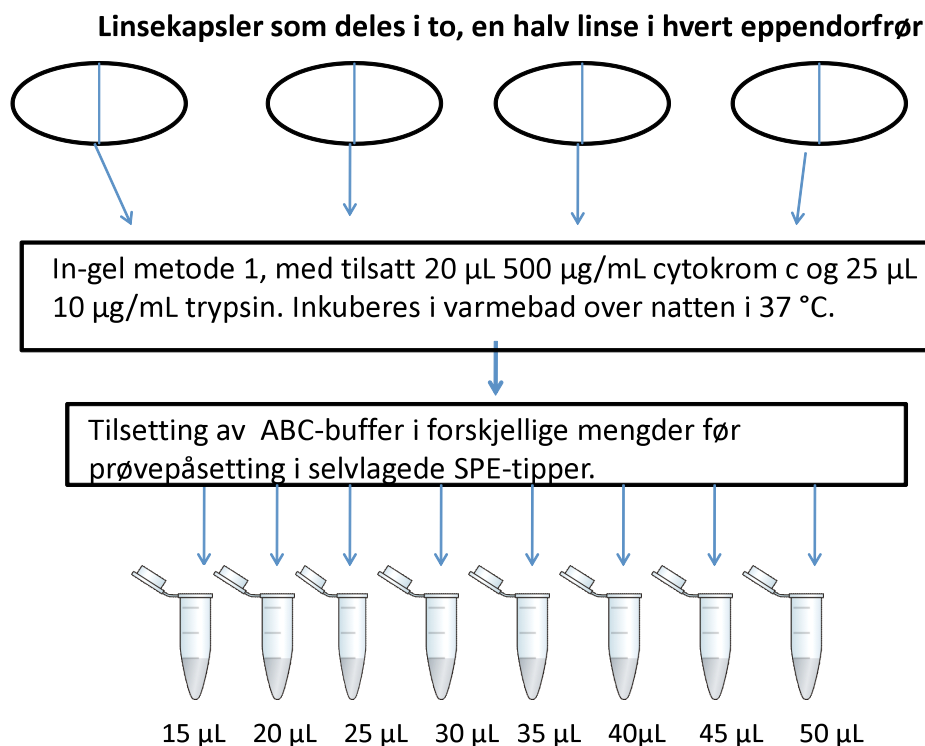
Figur 21: Antall peptidtreff etter SPE-prosedyrene og LC-MS/MS. OMIX 1 og OMIX 2 er to parallelle prøver som har blitt utført på samme måte, likeledes gjelder det også for SPE1 og SPE 2 som betyr selvlagede SPE-tipper.

Siden risikoen var større for tap av prøver med OMIX-tipper, og det ga økt sjanse for lang retensjonstid og brede topper, ble det valgt å bruke selvlagede SPE-tipper for videre forsøk.

6.1.3 Bestemmelse av mengde ABC-buffer som tilsettes før SPE

Før påsetting av prøve ved en fast-fase-ekstraksjon (trinn 3 i kapittel 5.9.2) ble det tilsatt ABC-buffer i prøven. I kapittel 4.3.2 er det blitt beskrevet at linsekapselen består av et nettverk av substanser som gjør at linsekapselen kan holde på formen sin. Utfordringen ble at linsekapselen ble veldig viskøst noe som gjorde det vanskelig å få prøven gjennom sorbenten. Ved utførelsen av SPE var det bare væsken som ble ekstrahert siden in-gel metode 1 og 2 skal trekke ut peptidene fra linsekapselen, men fordi prøven gjennomgår en redusering med DTT på 95 °C, og at prøven inkuberes i varmebad i 37 °C over natten, var det vanskelig å skille mellom væsken og linsekapselen ved pipettering.

Det ble derfor tilsatt ABC-buffer før prøvepåsetting for å øke væskemengden i prøven. Hensikten med forsøket var å sjekke hvor mye ABC-buffer som måtte tilsettes for å unngå at prøvematerialet tettet igjen sorbenten. For store mengder med ABC-buffer kan redusere intensiteten til substansene i linsekapselen. Det ble utført in-gel metode 1 og cytochrom c ble tilsatt rett etter tilsetting av trypsin. Modellproteinet, cytochrom c ble brukt for å kontrollere at intensiteten til cytochrom c ikke ble redusert ved for mye tilsetting av ABC-buffer. (Figur 22 illustrerer en skjematisk oversikt over forsøket.)

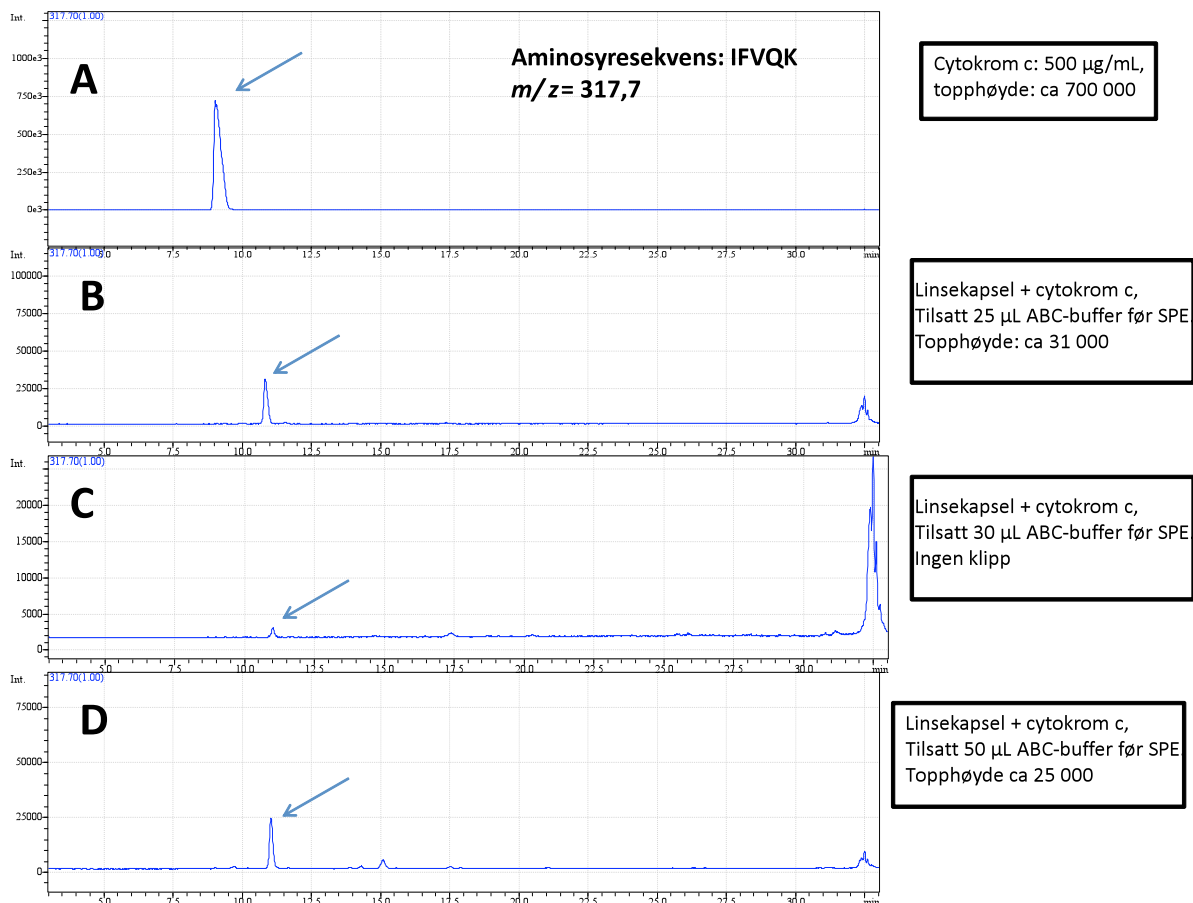


Figur 22: Skjematisk oversikt over forsøket.

Det ble i tillegg analysert cytokrom c 500 µg/mL som ble spaltet med trypsin dagen før kjøring på LC-MS. Intensitet på spaltet cytokrom c ble tatt som utgangspunkt da denne prøven ikke ble tilsatt ABC-buffer før SPE.

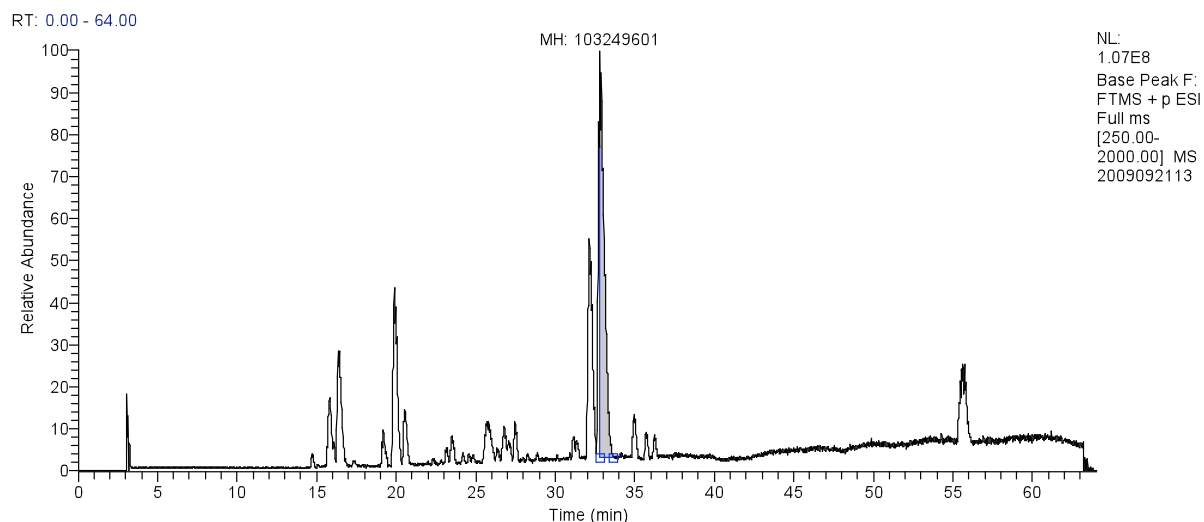
Det ble kjørt i SIM-modus for valgte SIM-verdier som er spesifikke for cytokrom c. Figur 23 viser kromatogrammer for cytokrom c med aminosyresekvens IFAVQ ($m/z = 317,7$). Det var vanskelig å utføre SPE både ved redusert og økt mengde av ABC-buffer, og mange av prøvene tettet igjen sorbenten på SPE. En årsak kan være at linsekapselen fulgte med under pipetteringen uansett hvilken mengde ABC-buffer som ble tilsatt. Det ble derfor bare resultater for 25, 30 og 50 µL. Resultatet viser at intensiteten til topphøyden avtok mellom kromatogram B og D på grunn av mer fortynning i D enn i B. Intensiteten til disse var lavere sammenlignet med A som verken var fortynnet eller tilsatt linsekapsler. Kromatogram C viste ingen synlig topp, en mulig årsak kan være at cytokrom c ikke kom i kontakt med trypsin i

ependorfrøret slik at cytochrom c ikke ble spaltet til peptidprodukter. Retensjonstiden for kromatogram B og D var forskjøvet i forhold til kromatogram A, en mulig årsak kan være påvirkning fra linsekapselen.



Figur 23: Kromatogrammer for aminosyresekvens IFVQK til cytochrom c ved tre forskjellige mengder med ABC-buffor.

Tidligere linsekapsler som har blitt analysert på LC-MS/MS viser at intensiteten til høyest topp ligger mellom 10^7 - 10^8 slik at fortynningen med ABC-buffor ikke reduserer intensiteten til linsekapslene nevneverdig. Figur 24 illustrerer analyse av linsekapsel på LC-MS/MS, den høyeste toppen har intensitet på 10^8 . Flere eksempler illustreres i vedlegg 9.1.



Figur 24: Analyse av linsekapsel på LC-MS/MS som viser at topphøyden på den høyeste topp er 10^8 .

Det viktigste ved prøvepåsetting var å unngå å få med linsekapselen under pipetteringen. Det ble besluttet å tilsette 25 μ L ABC-buffer som utgangspunkt før påsetting av prøve til sorbenten til SPE-tipper.

6.2 Analyse av linsekapsler med 1D-RPC

Linsekapsler fra ku inneholdt forurensninger som ønskes fjernet før injeksjon på RPC. Hensikten med in-gel metode 1 og 2 var å trekke ut proteiner fra linsekapselen for så å tilsette trypsin som spalter proteiner til mindre peptider. In-gel metode 1 og 2 innebærer noen trinn med vasking av linsekapselen med vann og acetonitril for å fjerne forurensninger og fjerning av DTT og IAA i løsningen. Som nevnt tidligere i kapittel 6.1.3 ble ikke selve linsekapselen brukt i SPE, men det var væsken som omringet linsekapselen som ble brukt til videre arbeid. Før injeksjon på RPC ble prøven inndampet og reløst i 50 μ L mobilfase A (bestående av 5 % metanol og 95 % 20 mM maursyre (v/v)). Resultatet viser at proteiner fra linsekapselen ble spaltet til mindre peptider. MS/MS-data ble sammenlignet med valgt databasen i SEQUEST, i

dette tilfellet brukes databasen til BOVINE. Resultatet viser at det var ulike kollagener (kollagen α -1(IV)kjede og kollagen α -2(IV) kjede) som var dominerende i prøvene. Dette var forventet da det var størst andel av kollagener i linsekapselen. Figur 25 illustrerer proteinidentifisering for to linsekapsler fra ku med utførelse av ingel metode 1, begge prøvene bestod av mye kollagen.

Accession #	Coverage	# Peptides	# AAs	Score	Description	1.
gi68565185	45.85	29	229	47.04	Collagen alpha-1(IV) chain	
gi68565186	48.02	14	227	17.60	Collagen alpha-2(IV) chain	
gi30794280	8.73	6	607	8.01	albumin [Bos taurus]	
gi5705922	18.83	6	239	6.93	bovine corneal protein 54; BCP 54 [Bos taurus]	
gi2624850	9.87	5	375	5.24	Chain A, Structure Of Bovine Beta-Actin-Profilin Complex With Actin Bound Atp Phosphates Solvent Accessible	
gi1071993	10.10	2	99	3.99	collagen alpha 2(IV) chain - bovine (fragments)	
gi298948	28.21	1	39	3.19	macrophage migration inhibitory factor, MIF {N-terminal} [cattle, brain, Peptide Partial, 39 aa]	
gi66774498	3.82	1	288	2.70	elongation factor 1 alpha [Obtusicauda coweni]	
gi418739	29.41	1	34	2.63	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating) (EC 1.2.1.12) - bovine (fragments)	
gi55562729	14.06	2	128	2.13	H2A histone family, member Z [Rattus norvegicus]	
gi1335076	12.77	2	141	2.00	alpha-2-globin [Homo sapiens]	
gi27819608	16.55	2	145	0.00	hemoglobin, beta [Bos taurus]	
gi230765	18.64	3	220	0.00	Chain E, Bovine Trypsin (E.C.3.4.21.4) Complex With A Modified SSI (Streptomyces Subtilisin Inhibitor) With Met 70 Replaced By Gly And Met 73 Replaced By Lys (SSI(M70G,M73K))	
gi4389318	5.96	2	151	0.00	Chain B, Nucleoside Diphosphate Kinase Isoform B From Bovine Retina	

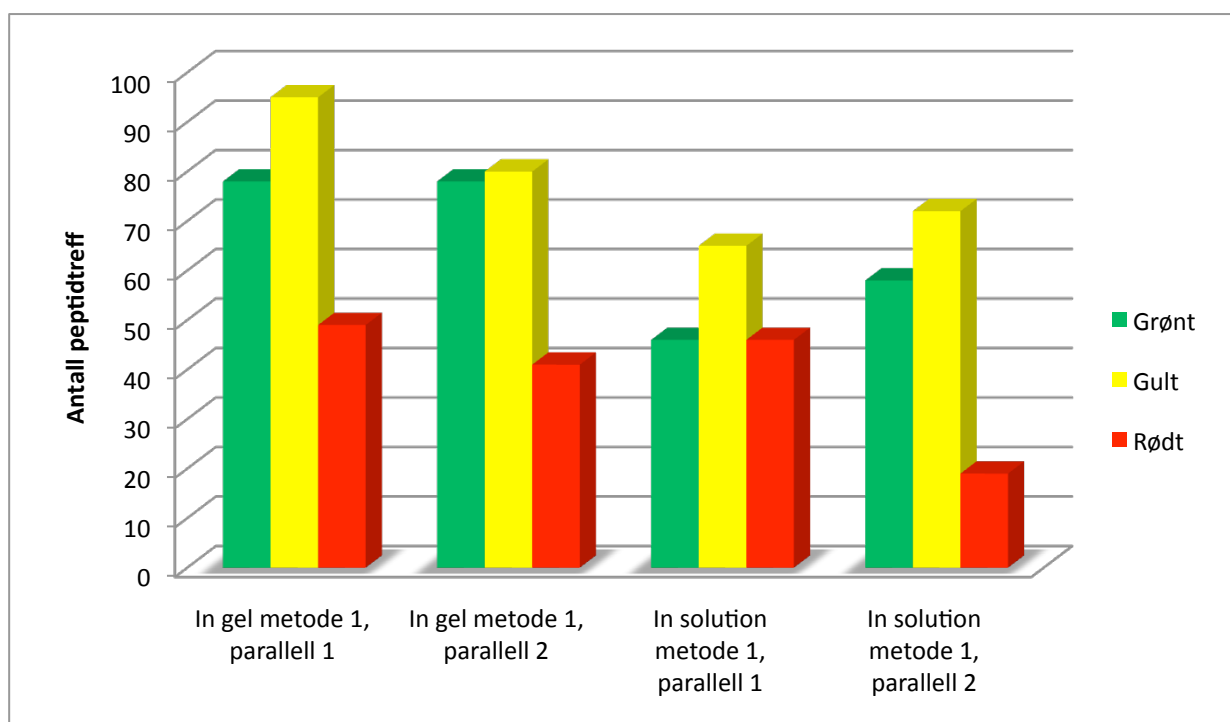
Accession #	Coverage	# Peptides	# AAs	Score	Description	2.
gi68565185	56.33	28	229	33.94	Collagen alpha-1(IV) chain	
gi68565186	58.15	13	227	10.96	Collagen alpha-2(IV) chain	
gi1071993	18.18	4	99	5.79	collagen alpha 2(IV) chain - bovine (fragments)	
gi30794280	5.93	4	607	5.41	albumin [Bos taurus]	
gi2624850	9.87	5	375	2.97	Chain A, Structure Of Bovine Beta-Actin-Profilin Complex With Actin Bound Atp Phosphates Solvent Accessible	
gi298948	28.21	1	39	2.84	macrophage migration inhibitory factor, MIF {N-terminal} [cattle, brain, Peptide Partial, 39 aa]	
gi66774498	3.82	1	288	2.43	elongation factor 1 alpha [Obtusicauda coweni]	
gi13399501	17.82	6	174	1.94	Chain A, The C18s Mutant Of Bovine (Gamma-B)-Crystallin	
gi14488450	6.38	1	141	1.82	Chain C, The X-Ray Structure Determination Of Bovine Carbonmonoxy Hb At 2.1 Å Resolution And Its Relationship To The Quaternary Structure Of Other Hb Crystal Forms	
gi27819608	22.76	4	145	1.78	hemoglobin, beta [Bos taurus]	
gi108593	22.03	2	59	1.76	centromere-specific histone CENP-A - bovine (fragments)	
gi5705922	11.30	3	239	0.00	bovine corneal protein 54; BCP 54 [Bos taurus]	
gi71414	12.69	1	402	0.00	collagen alpha 2(I) chain - bovine (fragment)	
gi631541	2.88	1	382	0.00	aldehyde oxidase (EC 1.2.3.1) - bovine (fragment)	
gi82750112	9.31	3	569	0.00	bovine pathogenicity island protein (Orf13 and Orf14) [Staphylococcus aureus RF122]	

Figur 25: Proteinidentifisering av linsekapsel fra ku.

Siden det var mulig å identifisere proteininnholdet i linsekapselen, viste dette at trypsin utførte klipp på linsekapselen.

6.2.1 Antall peptidtreff for in-gel metode 1 og in-solution metode 1

Figur 26 illustrerer om det er hensiktsmessig å benytte in-gel metode 1 eller in-solution metode 1. To parallelle prøver tatt fra samme linsekapsel ble utført med in-gel metode 1 og to parallelle prøver tatt fra en annen linsekapsel ble utført med in-solution metode 1. In-gel metode 1 viste flere peptidtreff sammenlignet med in-solution metode 1, og at parallelle prøvene hadde tilnærmet lik antall peptidtreff. Dette kan indikere at med in-gel metode 1 ble det større sjanse for at proteinene ble trukket ut fra linsekapselen og videre spaltet til peptider. Antall peptidtreff var også ulikt mellom parallelle prøvene med in-solution metode 1, repeterbarheten var også dårligere.

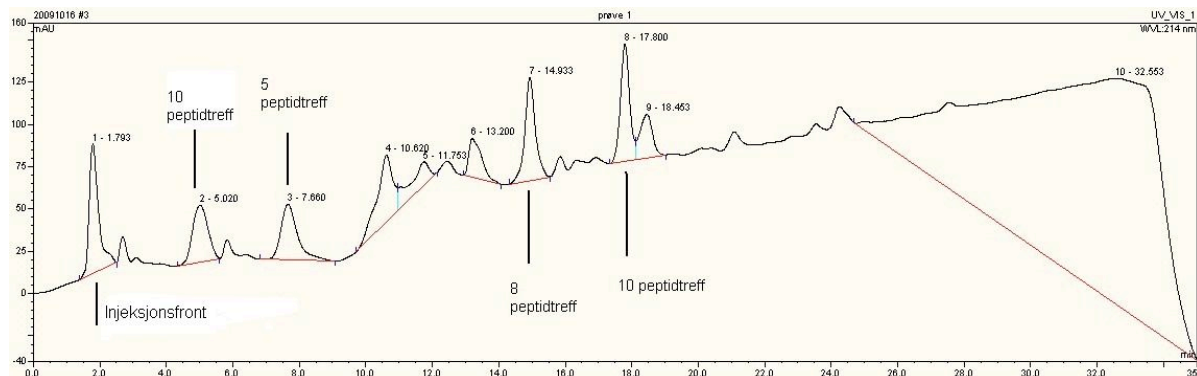


Figur 26: Antall peptidtreff etter in-gel metode 1 og in-solution metode.

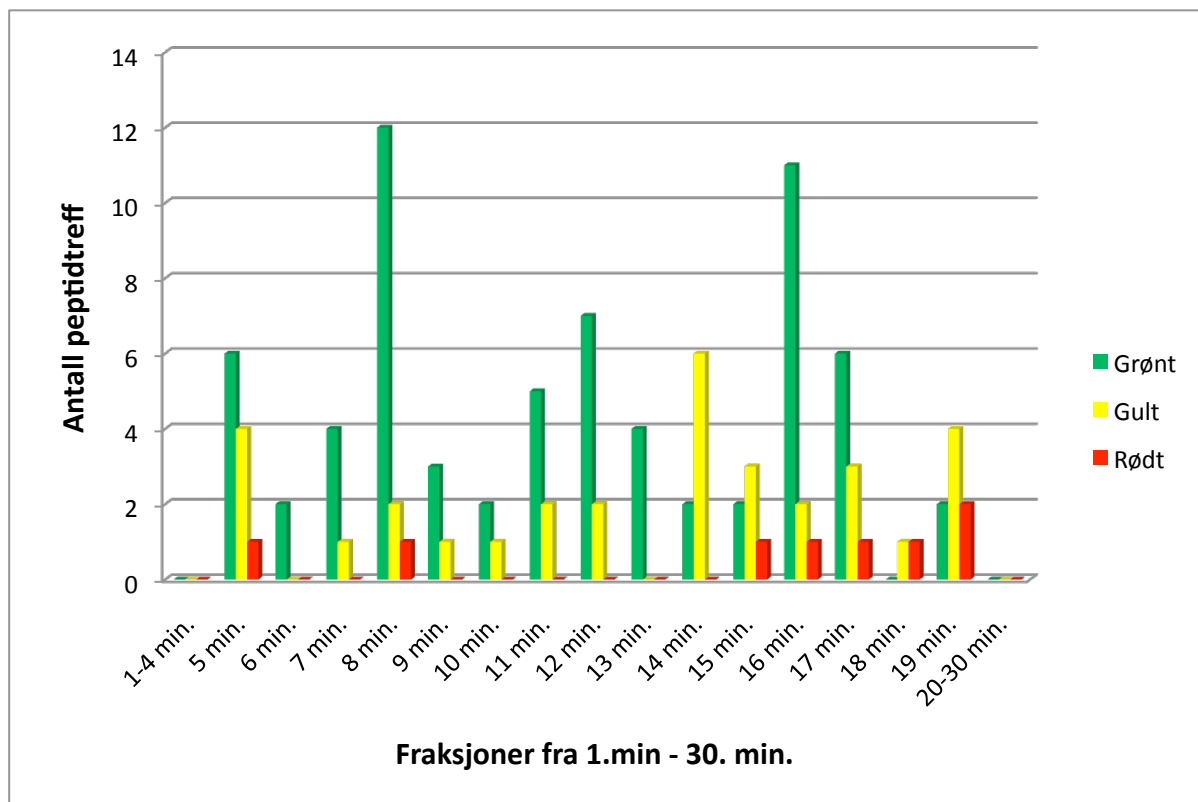
Ut fra dette forsøket ble det derfor valgt å bruke in-gel metode 1 til å spalte linsekapselens proteiner.

6.3 Analyse av linsekapsler med 2D-HILIC-RPC

Forsøk med 2.dimensjon vil vise om det blir bedre separasjon av peptider i linsekapselen og dermed flere proteinidentifikasjoner. Etter in-gel prosedyre og SPE ble prøven inndampet og reløst i mobilfase A bestående av 20 % mM NH_4Ac og 80 % ACN (v/v). Prøven ble injisert på HILIC og fraksjonert i 30 fraksjoner på ett minutt hver. Fraksjonene ble samlet i LoBind eppendorfrør som senere ble inndampet på SpeedVac. Ved 2. dimensjon ble fraksjonene reløst i 50 μL mobilfase A til RPC bestående av 95 % 20 mM maursyre og 5 % metanol (v/v) før de ble injisert på RPC. Fraksjonene ble injisert og analysert i stigende rekkefølge fra ett minutt til 30 minutter. Figur 27 illustrerer at det er topp i begynnelsen av kromatogrammet fra første dimensjon, men dette var injeksjonsfronten. Fra fem til 20 minutter er det synlige topper, når fraksjonene injiseres videre til andre dimensjon, og MS/MS-data sammenlignes med databasen SEQUEST som indikerer at det er flest peptidtreff mellom fem til 20 minutter, (se Figur 28).



Figur 27: HILIC-kromatogram.

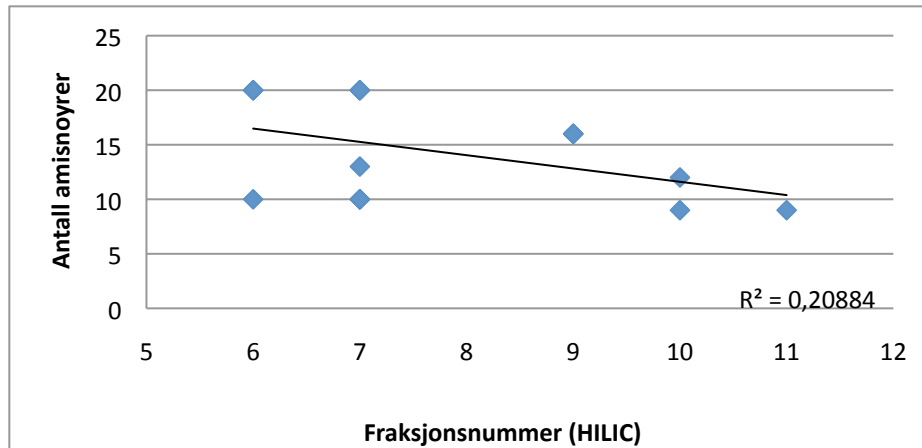


Figur 28: Diagram over antall peptidtreff per fraksjon fra 1. minutt til 30.minutt som hører til Figur 27.

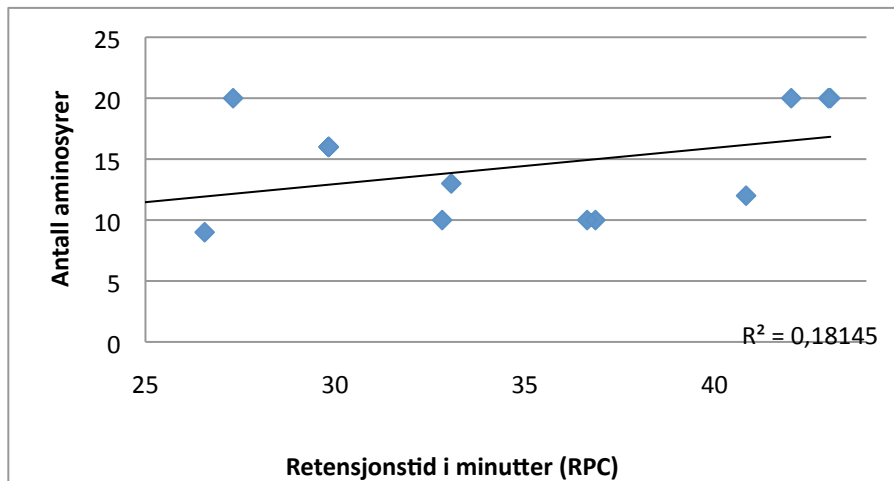
Figur 28 illustrerer tre forskjellige peptidtreff som kan forekomme, grønt, gult eller rødt. Tilsvarende forsøk med 2.dimensjon men med noen små endringer på prøveopparbeidelsen, kan ses i vedlegg kapitel 9.2 For alle resultatene (se Figur 38, 40 og 42 i vedlegg 9.2) vises det at var flest peptidtreff mellom fraksjon 5.-16. minutt og veldig få peptidtreff i de første fraksjonene og etter fraksjon 17. minutt.

Retensjonsrekkefølge i HILIC og RPC

Prinsippet til HILIC er at hydrofile stoffer retarderer mest. Figur 29 viser en trend at peptider med lange aminosyresekvenser elueres ut før korte aminosyresekvenser. Dette kan bety at peptider med lange aminosyresekvenser gir nedsatt hydrofile egenskaper. For RPC er prinsippet motsatt, økende aminosyresekvens gir økt retensjonstid, dette kan ses i Figur 30.



Figur 29: Illustrerer antall aminosyrer i peptidkjeden og fraksjonsnummer til peptider i HILIC.



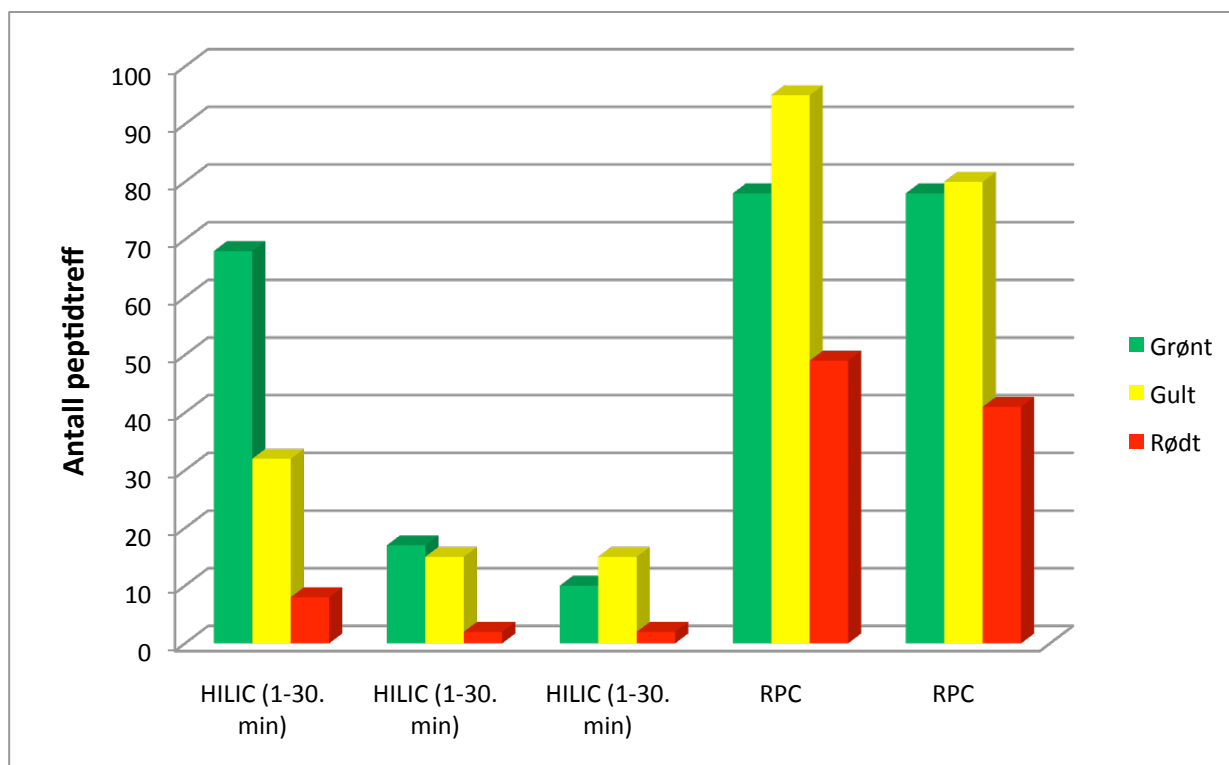
Figur 30: Illustrerer antall aminosyrer i peptidkjeden og retensjonstiden til peptidkjeden i RPC.

Disse resultatene viser at separasjonsprinsippet til HILIC og RPC stemmer med teorien som ble beskrevet i kapittel 4.9.

6.3.2 Sammenligning av 2D-HILIC-RPC med 1D-RPC

Bruk av HILIC viser at antall peptidtreff reduserte og repeterbarheten var dårligere i forhold til å injisere prøven direkte i RPC. Siden målet var å finne peptider for karakterisering av eksfoliasjonsmateriale var det risikabelt å anvende HILIC da det var stor sjanse for å miste peptider når det skulle utføres 2D-kromatografi. 2D-HILIC-RPC ble sammenlignet med 1D-RPC. Figur 31 viser total antall peptidtreff for

både 2D og 1D analyse. Det viste seg at bruk av 2D for to av prøvene ga færre peptidtreff enn med 1D. Den ene HILIC prøven viste flere peptidtreff i forhold til de to andre HILIC prøvene. En mulig årsak kan være at størrelsen på linsekapselen var varierende. Men totalt var antall peptidtreff færre enn for 1D-RPC. Dette skyldes sannsynligvis at prøven ikke var kompleks og det ikke var nødvendig å bruke to forskjellige separasjonsmetoder.



Figur 31: prøver til venstre viser resultater fra HILIC, og prøver til høyre viser resultater fra RPC (uten å anvende HILIC først).

Siden kromatografien i første dimensjon viste seg ikke å være så kompleks som antatt, ble det vurdert ikke å bruke 2D-HILIC- RPC ved analysing av pasientprøver.

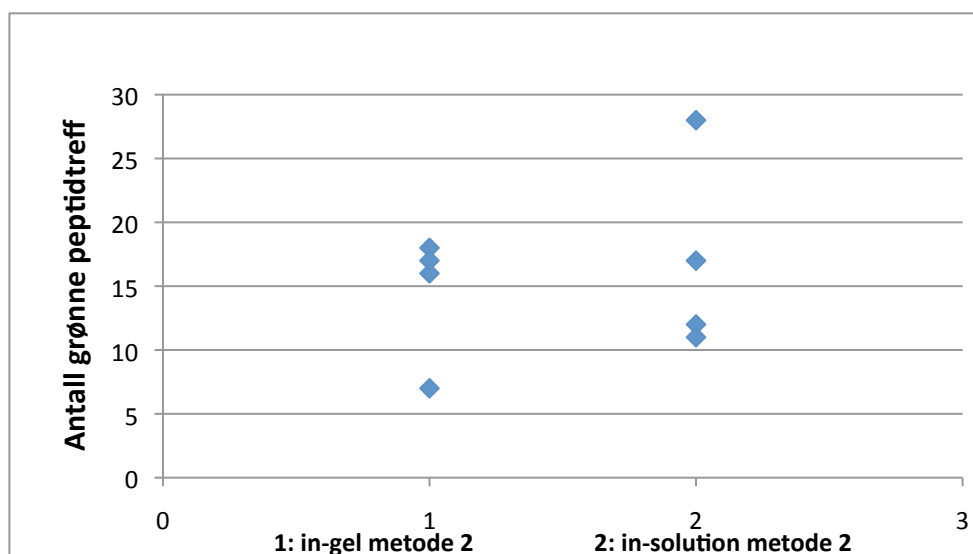
6.4 Endring av prøveoppbehandling

De forrige forsøkene har vist at det var mulig å spalte proteiner fra linsekapsler hos ku til peptider, og som videre injiseres på RPC. Resultatet fra MS/MS-data viste

substanser i linsekapsel fra ku som var forventet å finne. Proteinidentifiseringen kan ses i kapittel 6.2.

Neste trinn var å overføre prøveopparbeidelsen som ble brukt til ku over til linsekapsler fra pasienter. I og med at pasientprøvene var betydelig mindre enn linsekapsler fra ku var det vanskelig å utføre in-gel metode 1. En av de største utfordringene var å registrere om linsekapselen befant seg i eppendorfrøret under vaskeprosessen. Linsekapselen fra ku var mer forurensset enn pasientprøvene. Fra ku ble hele øyet først tatt ut og deretter linsekapselen. Dette førte til flere forurensninger og andre materialer som pasientprøver ikke hadde. Det var derfor viktig å ha en prosedyre som kunne fjerne disse forurensningene før injisering i LC-MS/MS.

Linsekapselen fra ku ble delt i små biter som var på tilsvarende størrelse som pasientprøvene. In-gel metode 2 ble utført, som er lik in-gel metode 1 men i andre konsentrasjonsmengder. (Mengdene vises i Tabell 6.) Ved fjerning av væske ble det brukt mikroskop for å bekrefte at linsekapselen fortsatt var i eppendorfrøret. Denne metoden ble sammenlignet med in-solution metode 2. Hensikten var å finne ut hvilken metode som gav flest antall peptidtreff. Grunnen til at væsken ikke ble fjernet i in-solution metode 2 var å redusere risikoen for å miste linsekapselen underveis. In-gel metode 2 kan fjerne peptider som var ønskelig å identifisere under vaskeprosedyren, men dette unngås i in-solution metode 2. Figur 32 illustrerer antall grønne peptidtreff ved bruk av in-gel metode 2 og in-solution metode 2. Det ble gjort fire forsøk per metode.



Figur 32: Illustrerer spredningen av antall grønne peptidtreff for forsøk med eller uten in-gel metode.

Spredningen var større med in-solution metode 2 enn for in-gel metode 2, men det var omtrent like mange peptidtreff med in-solution metode 2 som med in-gel metode 2. Det ble gjort samme forsøk i kapitel 6.2.1, men da med større linsekapsler. Resultatet fra kapitel 6.2.1 viste motsatt fra dette forsøket her. Sammenhengen kan være at prøvematerialet var så lite at bruk av in-gel metode 2 og in-solution metode 2 ikke utgjorde store forskjeller når antall peptidtreff sammenlignes. Begge metodene identifiserte omtrent like mange proteiner, og påvisning av kollagener var i begge metodene, dette kan ses i Figur 33 og Figur 34.

Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description	In-gel metode 2
gi20149797	40.36	15	223	29.23	Chain A, Trypsin Inhibitor Complex (Bpo)	
gi68565185	54.15	15	229	7.04	Collagen alpha-1(IV) chain	
gi30794280	10.21	6	607	6.44	albumin [Bos taurus]	
gi2624850	2.93	1	375	3.25	Chain A, Structure Of Bovine Beta-Actin-Profilin Complex With Actin Bound Atp Phosphates Solvent Accessible	
gi4139558	8.97	2	223	2.92	Chain E, Wild-Type Rat Anionic Trypsin Complexed With Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor (Bpti)	
gi27819608	15.17	2	145	2.56	hemoglobin, beta [Bos taurus]	
gi68565186	25.55	3	227	2.46	Collagen alpha-2(IV) chain	
gi1071993	10.10	1	99	2.44	collagen alpha 2(IV) chain - bovine (fragments)	

Figur 33: Oversikt over antall proteinidentifisering med in-gel metode 2.

Accession #	Coverage	# Peptides	#AAs	Score	Description	In-solution metode
gi20149797	49.78	22	223	35.08	Chain A, Trypsin Inhibitor Complex (Bpo)	
gi30794280	16.47	10	607	22.91	albumin [Bos taurus]	
gi68565185	17.90	6	229	9.62	Collagen alpha-1(IV) chain	
gi14488450	53.19	6	141	8.95	Chain C, The X-Ray Structure Determination Of Bovine Carbonmonoxy Hb At 2.1 Å Resolution And Its Relationship To The Quaternary Structure Of Other Hb Crystal Forms	
gi27819608	21.38	3	145	5.62	hemoglobin, beta [Bos taurus]	
gi68565186	8.81	2	227	4.54	Collagen alpha-2(IV) chain	
gi5705922	5.02	1	239	3.29	bovine corneal protein 54; BCP 54 [Bos taurus]	
gi2624850	2.93	1	375	2.67	Chain A, Structure Of Bovine Beta-Actin-Profilin Complex With Actin Bound Atp Phosphates Solvent Accessible	
gi1071993	10.10	1	99	2.21	collagen alpha 2(IV) chain - bovine (fragments)	
gi418739	29.41	1	34	2.17	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating) (EC 1.2.1.12) - bovine (fragments)	
gi66774498	3.82	1	288	1.90	elongation factor 1 alpha [Obtusicauda coweni]	
gi24940363	1.72	2	406	1.64	glycerol transporter subunit A [Mycoplasma sp. 'bovine group 7']	

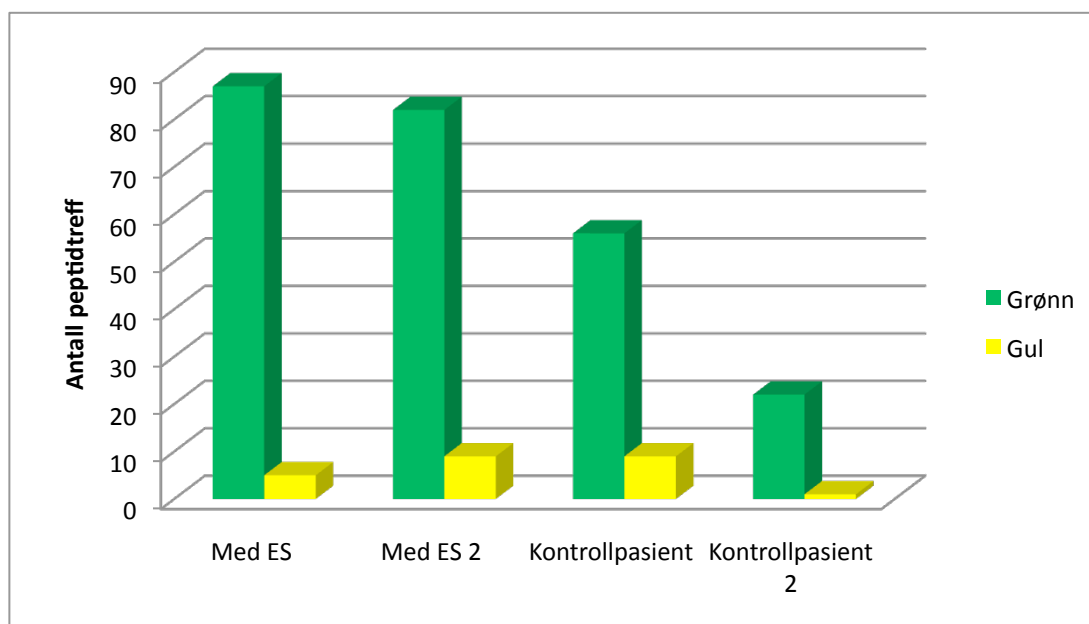
Figur 34: Oversikt over antall proteinidentifisering med in-solution metode 2.

Siden pasientprøvene var små og risikoen var stor for at de ble fjernet under vaskingen med in-gel metode 2, ble det bestemt å anvende in-solution metode 2 hos pasientene.

6.5 Analyse av pasientprøver

Som tidligere nevnt i kapitel 5.7.2 ble det brukt pasientprøver fra pasienter med grå stær. Det ble analysert to prøver fra pasienter med grå stær som har eksfoliasjonsmaterialet (ES) og to pasienter med grå stær som ikke har eksfoliasjonsmaterialet (kontrollgruppe).

Det ble anvendt in-solution metode 2 med begrunnelse beskrevet i kapitel 6.4. Etter utførelsen av in-solution metode 2 ble det utført SPE, inndamping og reløsning i mobilfase A før injisering på LC-MS/MS.



Figur 35: Antall peptidtreff for pasientene.

Figur 35 viser antall peptidtreff for pasientene som har blitt analysert. Pasienter med eksfoliasjonsmaterialet hadde høyere antall peptidtreff enn kontrollpasientene, noe som kan indikere at disse pasientene har proteiner som kan knyttes til eksfoliasjonsmaterialet. Kontrollpasient 2 skiller seg ut fra de andre ved at det var færre proteintreff og proteinidentifiseringen var også lav, (se Figur 44 i vedlegg 9.3).

En mulig årsak kan være at trypsineringen ikke har fungert optimalt slik at det har blitt få spalteprodukter.

Ved søking med SEQUEST ble det brukt database for human. Søking i SEQUEST viste mange felles proteintreff for pasienter med eksfoliasjonsmaterialet og kontrollgruppen, samt noen få treff som kun pasienter med eksfoliasjonsmaterialet har, (se Figur 36).

Accession #	#AAs	Description	ΣCoverage	Σ#Peptides	Score B3	Coverage B3	#Peptides B3	Score C3	Coverage C3	#Peptides C3	Score D3	Coverage D3	#Peptides D3
IPI:IPI00418471.6	466	<u>Vimentin</u>	25.32	24	28.30	19.74	9	22.38	13.73	6	25.15	20.60	9
IPI:IPI00942979.1	623	<u>Transketolase</u>	13.80	18	23.33	8.99	6	15.13	9.79	6	19.28	12.52	6
IPI:IPI00021369.1	175	<u>Alpha-crystallin B chain</u>	42.86	15	17.57	33.14	4	17.25	33.14	5	17.85	42.86	6
gi20149797	223	Chain A, Trypsin Inhibitor Complex (Bpo)	39.91	13									
IPI:IPI00465248.5	434	<u>Isoform alpha-enolase of Alpha-enolase</u>	15.44	12	10.52	15.44	4	14.23	15.44	5	9.40	10.37	3
IPI:IPI00306322.2	171	<u>Collagen alpha-2(IV) chain</u>	4.67	11	11.68	3.27	3	17.65	2.22	4	12.47	4.09	4
IPI:IPI00218914.5	501	<u>Retinal dehydrogenase 1</u>	11.38	10	17.04	9.78	4	10.32	3.99	2	11.07	5.79	4
IPI:IPI00218918.5	346	<u>Annexin A1</u>	13.58	10	15.81	13.58	4	9.47	10.40	3	9.10	10.40	3
IPI:IPI00021062.1	173	<u>Alpha-crystallin A chain</u>	19.08	10	13.06	19.08	4	11.37	13.29	2	13.48	19.08	4
IPI:IPI00296922.4	179	<u>Laminin subunit beta-2</u>	3.34	10	5.08	1.17	2	9.78	2.22	3	15.52	3.34	5
IPI:IPI00218247.3	211	<u>Metalloproteinase inhibitor 3</u>	25.12	10	12.29	15.17	3	5.83	5.69	1	12.96	25.12	6
IPI:IPI00795633.1	448	<u>CLU</u>	10.49	9	9.54	10.49	4	9.80	6.47	2	7.99	8.26	3
IPI:IPI00218748.3	205	<u>Beta-crystallin B2</u>	19.02	8	9.60	15.12	3	6.91	11.22	2	7.30	15.12	3
IPI:IPI00873684.1	131	<u>Isoform 2 of Collagen alpha-1(IV) chain</u>	2.96	7	7.02	1.06	1	10.50	2.96	4	10.08	2.20	2
IPI:IPI00795075.1	241	<u>lactate dehydrogenase A isoform 5</u>	11.20	6	8.92	11.20	3	1.72	0.00		7.94	11.20	3
IPI:IPI00894365.2	351	<u>cDNA FLJ52842, highly similar to Actin, cytoplasmic 1</u>	13.39	5	10.14	13.39	3	2.41	3.70	1	4.77	4.56	1
gi55562729	128	<u>H2A histone family, member Z [Rattus norvegicus]</u>	12.50	4	4.16	7.03	1	4.04	5.47	1			
IPI:IPI00554640.2	178	<u>Beta-crystallin S</u>	10.11	4	10.15	6.18	1	10.79	10.11	2	6.43	6.18	1
IPI:IPI00453473.6	103	<u>Histone H4</u>	29.13	4	7.63	21.36	2	2.20	7.77	1	6.76	9.71	1
IPI:IPI00847989.3	458	<u>Pyruvate kinase</u>	11.14	4	10.64	11.14	4	1.86	0.00		1.69	0.00	
IPI:IPI00169383.3	417	Phosphoglycerate kinase 1	7.67	3	7.66	7.67	2				3.04	3.60	1
IPI:IPI00298971.1	478	<u>Vitronectin</u>	9.00	3	2.33	0.00		3.94	0.00		15.14	9.00	3
IPI:IPI00396257.7	111	small inducible cytokine B14 precursor	13.51	3	2.00	6.31	1				3.95	13.51	2
IPI:IPI00939576.1	105	<u>cDNA FLJ5025, highly similar to Homo sapiens peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) (PP1A), transcript variant 2, mRNA</u>	8.57	3	2.14	8.57	1	2.36	8.57	1	2.16	8.57	1
IPI:IPI00298281.4	160	<u>Laminin subunit gamma-1</u>	0.87	3	3.28	0.87	1	4.20	0.87	1	5.25	0.87	1
IPI:IPI00478908.3	257	29 kDa protein	11.28	3	5.39	11.28	2				2.45	5.45	1
IPI:IPI00793922.1	83	9 kDa protein	34.94	3	4.03	18.07	1				4.87	34.94	2
IPI:IPI00909509.1	194	cDNA FLJ59138, highly similar to Annexin A2	13.40	3	7.48	13.40	2				1.93	8.25	1
IPI:IPI00946754.1	142	<u>Protease serine 1</u>	7.04	3	4.10	7.04	1	4.31	7.04	1	3.91	7.04	1
gi2624889	499	Chain D, Aldehyde Dehydrogenase From Bovine Mitochondria	3.01	2									
IPI:IPI00021842.1	317	Apolipoprotein E	3.79	2	2.65	3.79	1				1.88	0.00	1
IPI:IPI00219038.9	136	<u>Histone H3.3</u>	30.15	2	11.68	30.15	2	0.00	0.00		3.39	0.00	
IPI:IPI00293276.10	115	<u>Macrophage migration inhibitory factor</u>	7.83	2	2.51	7.83	1	2.10	7.83	1	1.83	0.00	
IPI:IPI00640057.2	228	<u>Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1</u>	2.63	2	1.94	0.00		4.22	2.63	1	1.98	2.63	1
IPI:IPI00796633.1	210	22 kDa protein	10.95	2	4.94	10.95	2	2.12	0.00		2.59	0.00	

IPI:IPI009 10950.1	2896-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	4.84	2	2.83	4.84	1				2.70	4.84	1
IPI:IPI002 16773.4	396ALB protein	6.31	2							5.11	6.31	2
gi108567	55calvasculin - bovine (fragments)	14.55	1									
IPI:IPI000 10360.2	167Isoform 1 of Collagen alpha-3(IV) 0chain	0.60	1	1.79	0.00		2.25	0.60	1	1.64	0.00	
IPI:IPI002 17465.5	213Histone H1.2	5.16	1	4.31	5.16	1						
IPI:IPI002 20403.3	126Histone H2B type 1-B	8.73	1	2.00	0.00		2.49	8.73	1			
IPI:IPI004 19012.3	267Uncharacterized protein C4orf44	4.49	1	1.69	0.00		2.05	4.49	1	1.84	0.00	
IPI:IPI003 82804.1	227EEF1A protein (Fragment)	4.85	1	2.21	4.85	1				1.78	0.00	
IPI:IPI007 92761.1	139cDNA FLJ60092, highly similar to 14-3-3 protein epsilon	8.63	1	3.06	8.63	1						
IPI:IPI007 94584.1	445 kDa protein	18.18	1	2.42	18.18	1						
IPI:IPI009 45715.1	113Zinc finger protein 487	11.50	1	1.63	0.00					2.08	11.50	1
IPI:IPI009 53417.1	243cDNA FLJ53012, highly similar to Tubulin beta-7 chain	7.41	1	2.40	0.00		2.95	7.41	1	0.00	0.00	
IPI:IPI003 84542.4	111Isoform 2 of Nidogen-1 4	1.17	1				2.57	1.17	1			
IPI:IPI008 52791.1	196Putative uncharacterized protein HFM1	4.08	1				1.68	4.08	1	1.54	0.00	
IPI:IPI008 92842.1	110Putative uncharacterized protein EHBP1	6.36	1				0.00	0.00		2.01	6.36	1
IPI:IPI004 70341.2	168Opticin	7.14	1							2.18	7.14	1

Figur 36: Illustrerer proteinidentifisering for pasientprøvene. Kolonne B og kolonne D er pasienter med ES og kolonne C er kontrollpasient. Med uthevet skrift betyr at kolonne B og D har lik treff, mens understrek betyr at alle har samme treff.

Søk i www.uniprot.org viste at proteinene i pasienter med eksfoliasjonsmaterialet og kontrollpasient var substanser som finnes i øyet. Blant annet var det vimentin som er klasse-III intermediat filamenter som er komponenter i celleskjelettet, netthinne dehydrogenase, kollagen og glykoproteinet laminin. De sistnevnte opprettholder formen på linsekapselen. Enzymene pyruvat kinase og lactat dehydrogenase omdanner glukose i blodet til energi i form av ATP slik at linsen får tilført energi.

Proteiner som bare forekom i pasienter med eksfoliasjonsmaterialet ble identifisert som apolipoprotein E (som er tilstedeværende i kylomikroner i leverceller), enzymene fosfoglycerat kinase og 6-fosfogluconat dehydrogenase, annexin II (som deltar i cellulære prosesser som cellemotiliteten, endocytose og celleskjelettet). Det

var også oppgitt to proteiner som ikke er blitt identifisert, men kun oppgitt med atommassen.

Det har bare blitt analysert fire pasientprøver til sammen, og det gir lite grunnlag for å si at det har blitt funnet protein som har tilknytning til ES. Resultatet viser imidlertid at det var mulig å trekke ut proteiner fra pasientprøvene og at trypsin utførte spalting på proteiner til mindre peptidprodukter. For å kunne si at disse har klinisk verdi, kreves det flere analyser av pasientprøver. En større pasientgruppe må analysere før man fastslår at linsekapselen hos pasienter med eksfoliasjonsmaterialet er forskjellig fra kontrollgruppen.

7. Konklusjon

I denne oppgaven ble linsekapsel fra ku brukt som prøvematerial for å sette opp et LC-MS/MS system for bestemmelse av proteininnhold i linsekapsel fra pasienter med grå stær. Det ble først testet at anvendelse av trypsin spaltet proteiner til peptider i nærvær av linsekapsel.

Videre ble det testet ulike digest metoder. In-gel metode ble brukt på linsekapsel fra ku fremfor in-solution metode siden det ga flest peptidtreff. De fleste forekommende proteiner i prøven bestod av forskjellige typer kollagener.

For pasienter ble det brukt in-solution metode fremfor in-gel metode av hensyn til mengde prøvemateriale, og at antall peptidtreff var likt ved bruk av begge digest metodene.

Selvlagede SPE-tipper ble valgt som prøveopparbeidelse fremfor OMIX-tipper grunnet bedre retensjonstid og smalere topper i kromatogrammet. Siden det skulle identifiseres et ukjent protein som skulle være karakteristisk for eksfoliasjonsmaterialet var det viktig å unngå tap av proteiner underveis i prosedyren.

Anvendelse av 2D-kromatografi var ikke nødvendig da prøven ikke var så kompleks som antatt.

Oppgaven viste at det var mulig å trekke proteiner ut av pasientprøver og som videre spaltes til peptidprodukter.

De fleste forekommende proteiner i pasienter med og uten eksfoliasjonsmaterialet var blant annet vimentin, kollagen og glykoproteinet laminin. Dette er substanser som opprettholder formen og funksjonen på linsekapselen.

Det kreves analyse av flere pasientprøver for å bekrefte at proteiner som ble funnet bare hos pasienter med eksfoliasjonsmaterialet har klinisk verdi.

8. Kildeliste

1. Vesti, E. and T. Kivelä, *Exfoliation syndrome and exfoliation glaucoma*. Progress in Retinal and Eye Research, 2000. **19**(3): p. 345-368.
2. Silberring, J. and P. Ciborowski, *Biomarker discovery and clinical proteomics*. Trends Analyt Chem. **29**(2): p. 128.
3. Saude, T., *Øyets anatomi og fysiologi*, ed. T. forlag. 1992.
4. *Norsk Farmaceutisk Tidsskrift*. [cited 2010 12.05]; Available from: <http://www.farmatid.no/id/448.0>.
5. Hazin, R., A.M. Hendrick, and M.Y. Kahook, *Primary Open-Angle Glaucoma: Diagnostic Approaches and Management*. Journal of the National Medical Association, 2009. **101**(1): p. 46-50.
6. 2007; Available from: <http://www.lasikindia.com/html/eyediseases.htm>.
7. Orr, A.C., et al., *Exfoliation syndrome: Clinical and genetic features*. Ophthalmic Genetics, 2001. **22**(3): p. 171-185.
8. Sowka, J., *Pseudoexfoliation syndrome and pseudoexfoliative glaucoma*. Optometry - Journal of the American Optometric Association, 2004. **75**(4): p. 245-250.
9. Dietlein, T.S., M.M. Hermann, and J.F. Jordan, *The Medical and Surgical Treatment of Glaucoma*. Deutsches Arzteblatt International, 2009. **106**(37): p. 597-BR1.
10. Krag, S. and T.T. Andreassen, *Mechanical properties of the human lens capsule*. Progress in Retinal and Eye Research, 2003. **22**(6): p. 749-767.
11. Danysh, B.P. and M.K. Duncan, *The lens capsule*. Experimental Eye Research, 2009. **88**(2): p. 151-164.
12. Burd, H., *A structural constitutive model for the human lens capsule*. Biomechanics and Modeling in Mechanobiology, 2009. **8**(3): p. 217-231.
13. Nelson, D.L. and M.M. Cox, *Lehninger Principles of biochemistry*. Fourth edition ed. 2005.
14. Liebler, D.C., *Introduction to Proteomics: Tools for the new biology*. 2002, Totowa, New Jersey: Humana Press Inc.
15. Johnson, C.J., et al., *Proteomics, nanotechnology and molecular diagnostics*. PROTEOMICS, 2008. **8**(4): p. 715-30.
16. Fields, S., *Proteomics. Proteomics in genomeland*. Science, 2001. **291**(5507): p. 1221-4.
17. Baldwin, M.A., *Protein Identification by Mass Spectrometry: Issues to be Considered*. Mol Cell Proteomics, 2004. **3**(1): p. 1-9.
18. Olsen, J.V., S.-E. Ong, and M. Mann, *Trypsin Cleaves Exclusively C-terminal to Arginine and Lysine Residues*. Mol Cell Proteomics, 2004. **3**(6): p. 608-614.
19. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Legemiddelanalyse*, ed. Fagbokforlaget. 2004.

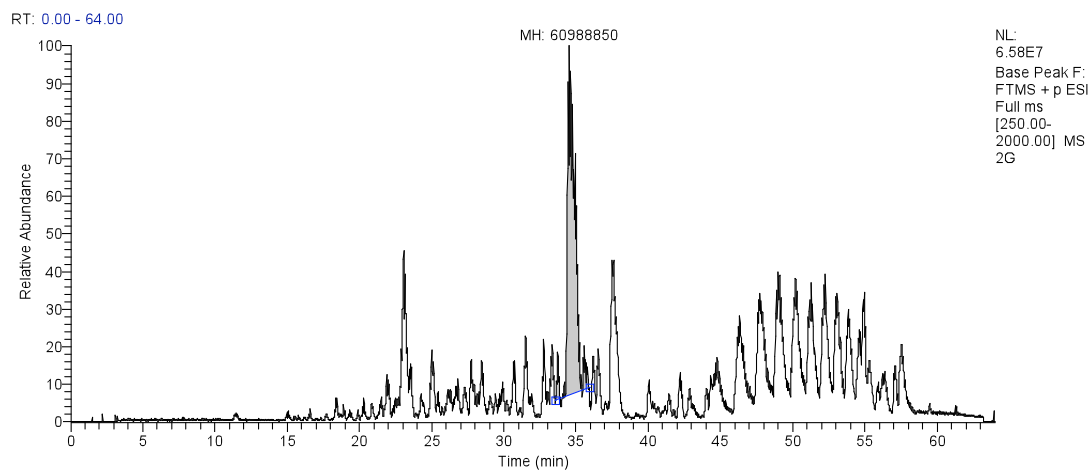
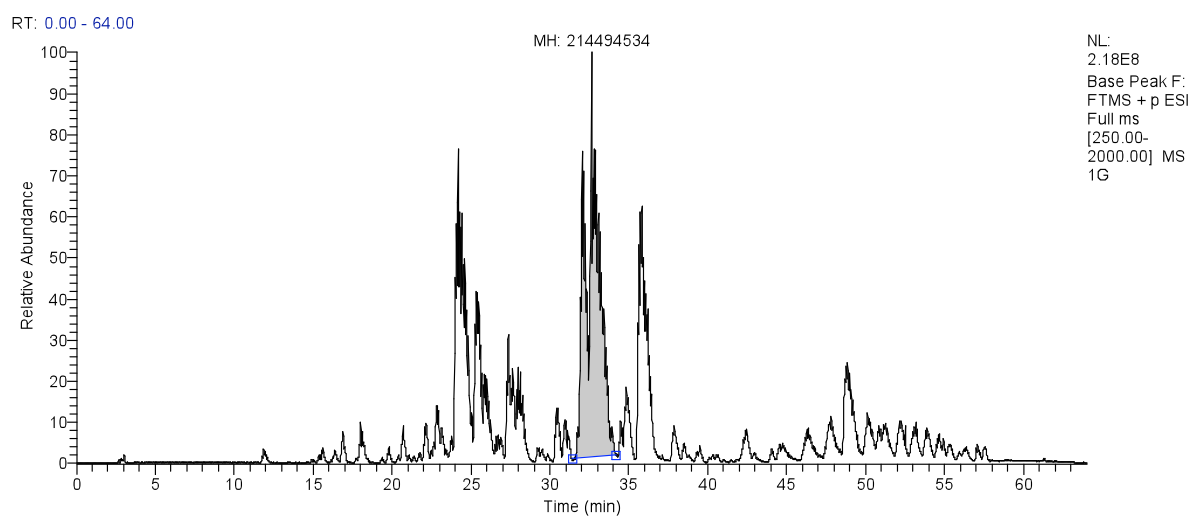
20. Lim, C.K. and G. Lord, *Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2002. **25**(5): p. 547-557.
21. Niessen, W.M.A., *Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening*. Journal of Chromatography A, 2003. **1000**(1-2): p. 413-436.
22. van den Broek, I., et al., *Quantitative bioanalysis of peptides by liquid chromatography coupled to (tandem) mass spectrometry*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2008. **872**(1-2): p. 1-22.
23. Gaskell, S.J., *Electrospray: Principles and practice*. Journal of Mass Spectrometry, 1997. **32**(7): p. 677-688.
24. Scigelova, M. and A. Makarov, *Orbitrap mass analyzer--overview and applications in proteomics*. PROTEOMICS, 2006. **6 Suppl 2**: p. 16-21.
25. Aebersold, R. and M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics*. Nature, 2003. **422**(6928): p. 198-207.
26. Hu, Q., et al., *The Orbitrap: a new mass spectrometer*. J Mass Spectrom, 2005. **40**(4): p. 430-43.
27. Hopfgartner, G., et al., *Triple quadrupole linear ion trap mass spectrometer for the analysis of small molecules and macromolecules*. Journal of Mass Spectrometry, 2004. **39**(8): p. 845-855.
28. Aebersold, R. and D.R. Goodlett, *Mass spectrometry in proteomics*. Chem Rev, 2001. **101**(2): p. 269-95.
29. Kicman, A.T., M.C. Parkin, and R.K. Iles. *An introduction to mass spectrometry based proteomics - Detection and characterization of gonadotropins and related molecules*. in *1st International Conference on Gonadotropins and Receptors*. 2005. Athens, GA: Elsevier Ireland Ltd.
30. Fenyő, D., *Identifying the proteome: software tools*. Current Opinion in Biotechnology, 2000. **11**(4): p. 391-395.
31. Olsen, J.V., et al., *Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap*. Mol Cell Proteomics, 2005. **4**(12): p. 2010-21.
32. Bushey, M.M. and J.W. Jorgenson, *Automated instrumentation for comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography of proteins*. Anal Chem, 1990. **62**(2): p. 161-7.
33. Hyötyläinen, T., *Principles, developments and applications of on-line coupling of extraction with chromatography*. Journal of Chromatography A, 2007. **1153**(1-2): p. 14-28.
34. Wagner, K., et al., *An automated on-line multidimensional HPLC system for protein and peptide mapping with integrated sample preparation*. Analytical Chemistry, 2002. **74**(4): p. 809-820.
35. Boersema, P., S. Mohammed, and A. Heck, *Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008. **391**(1): p. 151-159.

36. Hao, Z., B. Xiao, and N. Weng, *Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC)*. Journal of Separation Science, 2008. **31**(9): p. 1449-1464.
37. *A practical guide to HILIC - A tutorial and application book*, in *SeQuant Innovators in Chemical Analysis*. 2006.
38. Dejaegher, B., D. Mangelings, and Y. Vander Heyden, *Method development for HILIC assays*. J Sep Sci, 2008. **31**(9): p. 1438-48.
39. Nguyen, T.D., *Anvendelse av ZIC-HILIC i offline todimensjonal væskrokromatografi for analyse av tryptisk klippet proteiner i urin*, in *Avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt*. 2008, Universitet i Oslo: Oslo. p. 61.
40. Kohnen, T., et al., *Cataract Surgery With Implantation of an Artificial Lens*. Deutsches Arzteblatt International, 2009. **106**(43): p. 695-U11.
41. *OMIX User Guide - Pipette Tips for Micro Extractions*. [cited 2010 27.04.10]; Available from: <http://www.varianinc.com/image/vimage/docs/products/biosolutions/omix/shared/pdfs/OMIXug.pdf>.
42. Zhang, Y., et al., *Effect of Dynamic Exclusion Duration on Spectral Count Based Quantitative Proteomics*. Analytical Chemistry, 2009. **81**(15): p. 6317-6326.
43. *Dynamic Exclusion Technology*. [cited 2010 26.04]; Available from: http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Articles/articlesFile_21286.pdf.
44. Razumovskaya, J., et al., *A computational method for assessing peptide-identification reliability in tandem mass spectrometry analysis with SEQUEST*. PROTEOMICS, 2004. **4**(4): p. 961-9.

9. Vedlegg

9.1 Kromatogrammer for analyse av linsekapsler

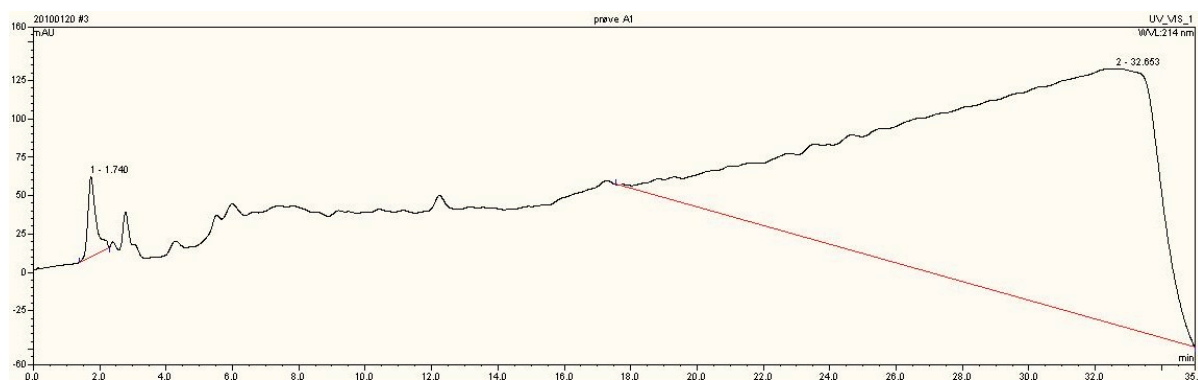
Figurene under viser at den høyeste toppen for hvert kromatogram har topphøyde 10^7 - 10^8 .



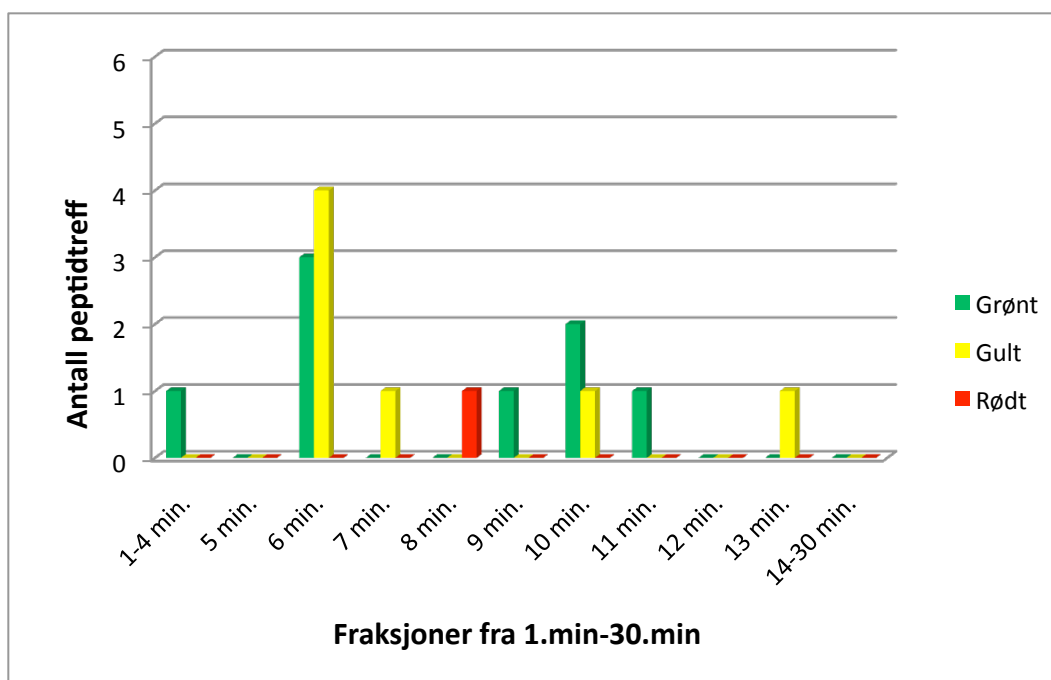
9.2 Forsøk med 2D-HILIC-RPC

Alle prøvene er blitt utført med in-gel metode 1 og med linsekapsler fra ku, men med noen små justeringen på rekkefølgen til prosedyren. Dette for å finne ut hva i prosedyren som gjør at antall peptidtreff er så varierende for hvert forsøk når det teoretisk sett skulle være likt. Prøvematerialet og in-gel metode 1 er utført på samme måte.

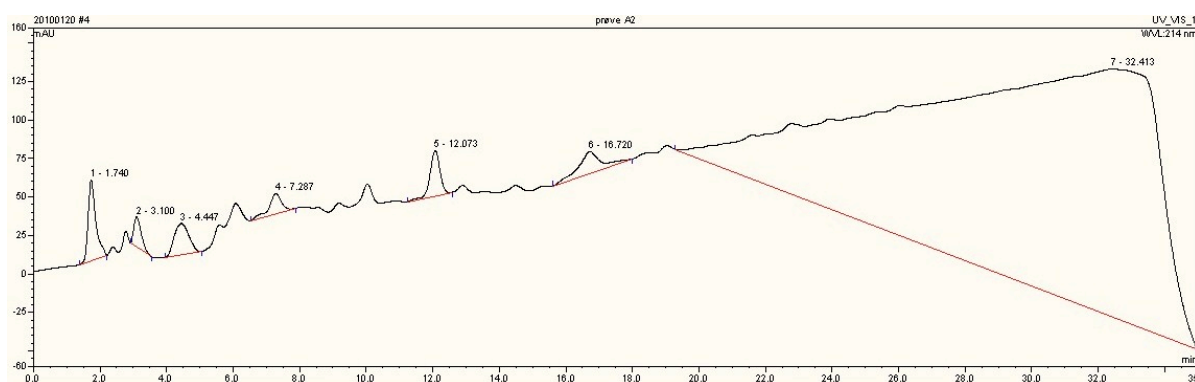
Forsøk a: to parallelle prøver (kalt prøve a og prøve a2) fra samme linsekapsel, men som har blitt delt i to før in-gel metode 1 og fast-fase-ekstraksjon med selvlagede SPE-tipper. Hensikten med forsøket var å finne ut om utførelsen av metoden ga samme resultat da prøvematerialet var fra samme linsekapsel.



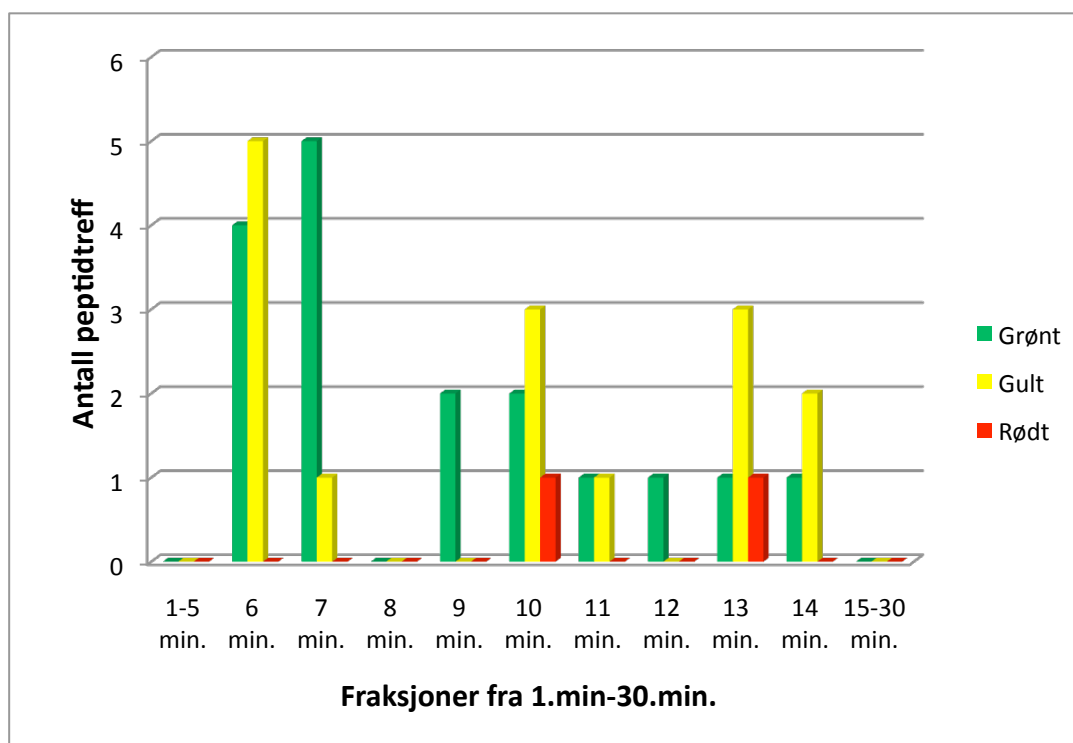
Figur 37: HILIC-kromatogram for prøve a.



Figur 38: Diagram over antall peptidtreff per fraksjon fra 1. min - 30. minutt som tilhører til Figur 37.



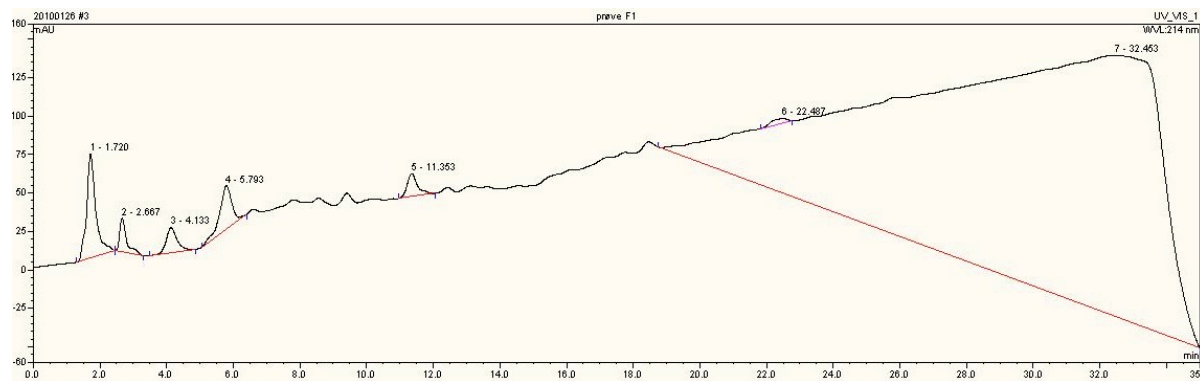
Figur 39: HILIC-kromatogram for prøve a2.



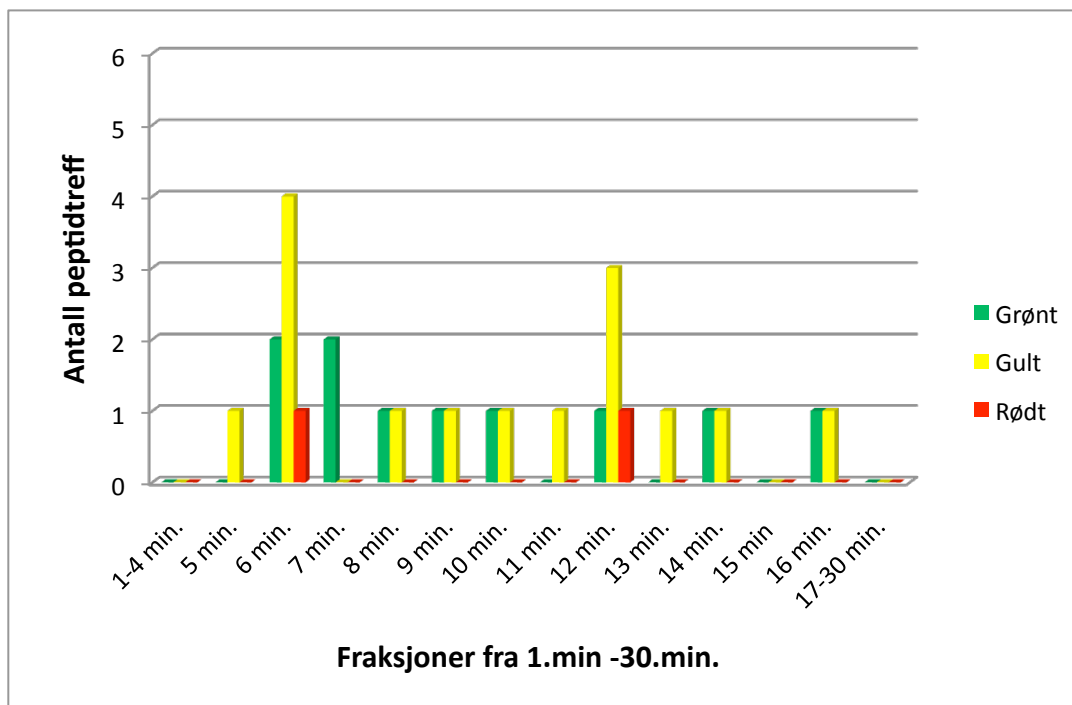
Figur 40: Diagram over antall peptidtreff per fraksjon fra 1. min - 30. minutt som tilhører til Figur 39.

Kromatogrammet i Figur 37 har færre toppe enn kromatogrammet i Figur 39, som igjen viser at antall peptidtreff er lavere for Figur 38 enn for Figur 40. Teoretisk skulle kromatogrammene være like da prøve a og prøve a2 er opparbeidet på samme måte. En av årsakene til forskjellen kan likevel være prøveoppbevaringen. Det utføres mange trinn i prosedyren slik at det er mulighet for tap av peptider underveis. Det ble derfor gjort ett nytt forsøk med tanke på at SPE kan være en årsak til at to identiske prøver ikke får lik HILIC-kromatogram da prøveoppsettet til SPE-tipper kan være et kritisk punkt.

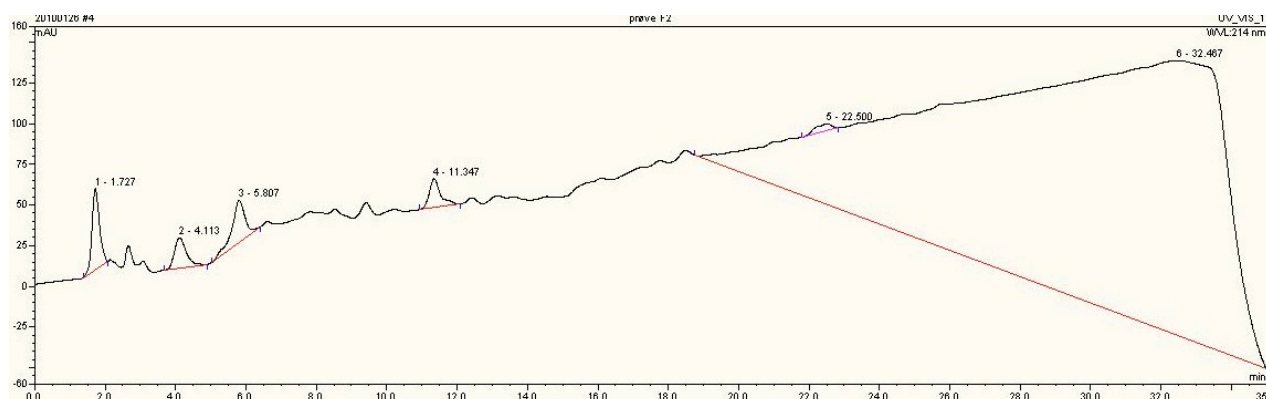
Forsøk b: to parallelle prøver (prøve b og prøve 2b) som er fra samme linsekapsel, men som har blitt delt i to før in gel metoden og deretter blandet sammen før SPE prosedyre. Selve SPE utførelsen er gjort med to forskjellige selvlagede SPE-tipper. Hensikten med forsøket var å sjekke om årsaken til ulikheter til HILIC-kromatogrammene var på grunn av SPE.



Figur 41: HILIC-kromatogram for prøve b.



Figur 42: Diagram over antall peptidtreff per fraksjon fra 1. min - 30. minutt som tilhører til Figur 41.



Figur 43: HILIC kromatogram for prøve b2.

Figur 41 og Figur 43 er tilnærmet identiske, og dette indikerer at fast-fase-ekstraksjonen ikke er årsaken til ulikheter for prøve a og prøve a2. Siden HILIC-kromatogrammene var identiske, ble det valgt å kjøre 2.dimensjon RPC for prøve b2.

9.3 Analyse av pasientprøve

Analyse av kontrollpasient 2 som viser at det var færre proteintreff og at proteinidentifiseringen var lav i forhold til de andre pasientprøvene.

Accession #	Coverage	# Peptides	# AAs	Score	Description
gi20149797	39.91	13	223	37.22	Chain A, Trypsin Inhibitor Complex (Bpo)
gi68565185	10.48	2	229	7.91	Collagen alpha-1(IV) chain
gi68565186	6.61	1	227	5.42	Collagen alpha-2(IV) chain
gi2624850	4.27	1	375	4.75	Chain A, Structure Of Bovine Beta-Actin-Profilin Complex With Actin Bound Atp Phosphates Solvent Accessible
gi4139558	4.48	1	223	3.03	Chain E, Wild-Type Rat Anionic Trypsin Complexed With Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor (Bpti)
gi55562729	12.50	2	128	2.09	H2A histone family, member Z [Rattus norvegicus]
gi2624889	3.01	2	499	1.78	Chain D, Aldehyde Dehydrogenase From Bovine Mitochondria
gi108567	14.55	1	55	1.68	calvasculin - bovine (fragments)

Figur 44: Proteinidentifisering av pasientprøve uten eksfoliasjonsmaterial.